



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ & ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Έλεγχος της ασφάλειας και της ποιότητας σαλάτας μαρουλιού με τη χρήση κλασικών και ταχέων μεθόδων που στηρίζονται στη φασματομετρία

Χρυσανγή Γ. Τζαβάρα

Επιβλέπων Καθηγητής:

Χωριανόπουλος Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ

Αθήνα, 2024

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Έλεγχος της ασφάλειας και της ποιότητας σαλάτας μαρουλιού με τη χρήση κλασικών και ταχέων μεθόδων που στηρίζονται στη φασματομετρία

“Monitoring the safety and quality of lettuce salad using classical and rapid methods based on spectroscopy”

Χρυσανγή Γ. Τζαβάρα

Εξεταστική Επιτροπή:

Χωριανόπουλος Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Σκανδάμης Παναγιώτης, Καθηγητής ΓΠΑ

Παπαδημητρίου Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής ΓΠΑ

Έλεγχος της ασφάλειας και της ποιότητας σαλάτας μαρουλιού με τη χρήση κλασικών και ταχέων μεθόδων που στηρίζονται στη φασματομετρία

ΠΜΣ Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων & Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι καταναλωτικές συνήθειες παγκοσμίως προσανατολίζονται προς έναν πιο υγιεινό τρόπο ζωής με γρήγορες λύσεις για εξοικονόμηση χρόνου, αυξάνοντας την κατανάλωση μαρουλιού (tomaine) σε μορφή έτοιμων προς κατανάλωση σαλατών. Ωστόσο λόγω διασταυρούμενων μολύνσεων κυρίως, τα φυλλώδη λαχανικά κατατάσσονται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας ως πιθανοί φορείς τροφιμογενών ασθενειών. Συγκριμένα, έχουν καταγραφεί ξεσπάσματα επιδημιών *Escherichia coli* και *Listeria monocytogenes*, δημιουργώντας ανησυχία στην επιστημονική κοινότητα. Ένας ήπιος, χωρίς τη χρήση χημικών συντηρητικών, τρόπος καταπολέμησης της ανάπτυξης των παραπάνω παθογόνων, καθώς και των αλλοιογόνων βακτηρίων που βρίσκονται στο μαρούλι, αποτελεί η βιοσυντήρηση με τη χρήση ωφέλιμων γαλακτικών βακτηρίων.

Επιπρόσθετα, η έγκαιρη και γρήγορη ανίχνευση της αλλοίωσης θα προλάμβανε σημαντικές καταστάσεις στα ιδιαίτερα αυτά ευαλλοιώτα προϊόντα, γι' αυτό γίνονται προσπάθειες για την εύρεση και ανάπτυξη σύγχρονων, μη επεμβατικών και ταχέων μεθόδων για την εκτίμηση της μικροβιολογικής ποιότητας και γενικότερα της αλλοίωσης αυτών, όπως η πολυφασματική απεικόνιση και η φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier.

Η παρούσα μελέτη είχε σαν στόχο τη συσχέτιση του μικροβιολογικών αποτελεσμάτων με τα δεδομένα που προέκυψαν από τις παραπάνω φασματικές ταχείες μεθόδους, για δείγματα έτοιμων προς κατανάλωση σαλατών μαρουλιού εμβολιασμένα με τους παθογόνους μικροοργανισμούς *E. coli* και *L. monocytogenes* και ψεκασμένα με την βιομάζα ή το υπερκείμενο του γαλακτικού βακτηρίου *Lactiplantibacillus pentosus* FMCC B281. Μέσω των δεδομένων που προέκυψαν, αναπτύχθηκαν γραμμικά μοντέλα που είχαν ως στόχο τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό του βαθμού αλλοίωσης. Συνολικά, μέσω των αποτελεσμάτων αξιολογήθηκε τόσο η επιρροή του *Lactiplantibacillus pentosus* στην ασφάλεια αλλά και την ποιότητα του μαρουλιού.

Πραγματοποιήθηκαν δυο ανεξάρτητα πειράματα, ένα για τα εμβολιασμένα δείγματα με *E.coli* και ένα για αυτά με *L. monocytogenes*. Τα πειράματα είχαν όμοιες όλες τις υπόλοιπες παραμέτρους, τις δυο θερμοκρασίες συντήρησης (4 και 10°C), την συσκευασία τροποποιημένης ατμοσφαιρας (MAP) και τρεις περιπτώσεις ψεκασμού (control, υπερκείμενο, βιομάζα). Στα δείγματα γινόταν οργανοληπτική αξιολόγηση, μέτρηση pH, εφαρμογή κλασικών μικροβιολογικών αναλύσεων, πολυφασματική απεικόνιση και φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier. Οι μικροοργανισμοί που εξετάστηκαν για την σαλάτα μαρουλιού ήταν η ολική μεσόφιλη χλωρίδα (OMX), τα βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, της οικογένειας Enterobacteriaceae, τα γαλακτικά βακτήρια (LAB), οι ζύμες και μύκητες, καθώς και τα βακτήρια *E.coli* ή *L. monocytogenes* για κάθε κύκλο πειράματος.

Στα μικροβιολογικά αποτελέσματα παρατηρήθηκε επίδραση της θερμοκρασίας συντήρησης, με παράταση του χρόνου ζωής στην χαμηλή θερμοκρασία (4°C). Οι κύριοι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί σε κάθε περίπτωση ήταν το γένος *Pseudomonas* και η οικογένεια Enterobacteriaceae. Δεν παρατηρήθηκε επίδραση των γαλακτικών βακτηρίων έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών. Το pH παρουσίασε μια σταθερή τάση κατά την διάρκεια την δειγματοληψίας.

Μέσω της οργανοληπτικής αξιολόγησης, παρατηρήθηκε η θετική επίδραση του *Lactiplantibacillus pentosus* FMCC B281 στην εμφάνιση των εμβολιασμένων δειγμάτων. Συγκεκριμένα, τα ψεκασμένα δείγματα με το υπερκείμενο και την βιομάζα διατήρησαν σχεδόν αναλλοίωτη την φρεσκάδα των φύλλων μαρουλιού συγκριτικά με την περίπτωση του control, απουσία δηλαδή βιοσυντήρησης.

Για την κατασκευή μοντέλων συσχέτισης με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα, ως δείγματα ανάπτυξης και επικύρωσης εξετάστηκαν τα δείγματα συγκεντρωτικά χωρίς να ταξινομούνται σε περιπτώσεις. Η κατασκευή του μοντέλου για την εκτίμηση της OMX στην σαλάτα μαρουλιού έγινε μέσω του αλγόριθμου της γραμμικής παλινδρόμησης με την μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R).

Τα μοντέλα που αναπτύχθηκαν μέσω των φασματοσκοπικών δεδομένων δεν επέδειξαν την αναμενόμενη και επιθυμητή απόδοση. Συγκεκριμένα, για την MSI, η τιμή του RMSE για την πρόβλεψη ισούται με 0.708 και 0.604 για τις συσκευές VideometerLab και VideometerLite αντίστοιχα. Η τιμή του R² ισούται με 0.331 και 0.347 αντίστοιχα για τα δύο παραπάνω όργανα. Όσον αφορά τις αντίστοιχες τιμές για το μοντέλο μέσω των

δεδομένων FTIR, η τιμή του RMSE για την πρόβλεψη είναι ίση με 0.847 και του R^2 ίση με 0.125.

Συμπερασματικά, είναι φανερό πως η χαμηλή θερμοκρασία συντήρησης σε συνδυασμό με την συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας συνέβαλαν θετικά στην παράταση του χρόνου ζωής του προϊόντος. Ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη επίδραση των γαλακτικών βακτηρίων στην παρεμπόδιση της ανάπτυξης των παθογόνων μικροοργανισμών. Η παρουσία τους όμως δεν υποβάθμισε τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος. Αντίθετα, ο ψεκασμός με *Lactiplantibacillus pentosus* FMCC B281 παρουσίασε βελτιωμένη εμφάνιση των φύλλων μαρουλιού, συγκριτικά με τα δείγματα με απουσία βιοσυντήρησης. Τα μοντέλα προσδιορισμού της OMX δεν κατάφεραν να αποδώσουν ικανοποιητικό αποτέλεσμα.

Επιστημονική περιοχή: Μικροβιολογία Τροφίμων

Λέξεις κλειδιά: μαρούλι, έτοιμη προς κατανάλωση σαλάτα, βιοσυντήρηση, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FTIR), πολυφασματική απεικόνιση (MSI)

Monitoring the safety and quality of lettuce salad using classical and rapid methods based on spectroscopy

*MSc Food Science & Technology
Department of Food Science & Human Nutrition
Laboratory of Microbiology & Food Biotechnology*

ABSTRACT

Consumption habits worldwide are shifting towards a healthier lifestyle with quick time-saving solutions, increasing the consumption of romaine lettuce in the form of ready-to-eat salads. However, mainly due to cross-contamination, leafy vegetables are classified by the World Health Organization as potential carriers of food-borne diseases. In this respect, outbreaks of *E. coli* and *L. monocytogenes* have been recorded, causing serious concerns. A mild way, without the use of chemical preservatives, to combat the growth of the above pathogens, as well as the pathogenic bacteria found in lettuce, is biopreservation with the use of beneficial lactic acid bacteria.

In addition, the early and fast detection of spoilage would prevent important situations in these particularly perishable products, that is why efforts are being made to find and develop modern, non-invasive and rapid methods to assess the microbiological quality and, more generally, the spoilage of their products, such as multispectral imaging and Fourier transform infrared spectroscopy.

The present study aims to correlate microbiological results with the data obtained from the spectroscopic methods for samples of ready-to-eat lettuce salads inoculated with *E. coli* and *L. monocytogenes* and sprayed with the biomass or the supernatant of the lactic acid bacterium *Lactiplantibacillus pentosus* FMCC B281. Using the data, linear models were developed to qualitatively and quantitatively determine the degree of spoilage. Overall, through the results, the effect of *Lactiplantibacillus pentosus* on both safety and quality of lettuce was evaluated.

Two independent experiments were performed, one for the inoculated samples with *E. coli* and one for *L. monocytogenes*. The experiments had identical all other parameters, the two storage temperatures (4 and 10°C), modified atmosphere packaging (MAP) and three spraying cases (control, supernatant, biomass). The samples were subjected to sensory evaluation, pH measurement, application of classical microbiological analyses, multispectral imaging and Fourier transform infrared spectroscopy. The microorganisms tested for lettuce salad were total mesophilic flora (TMF), *Pseudomonas*, bacteria of the

genus Enterobacteriaceae, lactic acid bacteria (LAB), yeasts and molds, as well as *E. coli* or *L. monocytogenes* bacteria for each experiment.

Regarding the microbiological results, the effect of the storage temperature was evident, with a prolonged shelf life at low temperature (4°C). The main spoilage microorganisms in each case were the genus *Pseudomonas* and the family Enterobacteriaceae. However, no effect of lactic acid bacteria against pathogens was observed. The pH showed a stable trend during sampling.

Through sensory evaluation, the effect of *Lactiplantibacillus pentosus* FMCC B281 on the appearance of the samples was evident. The samples sprayed with supernatant and biomass maintained almost unchanged the freshness of lettuce leaves compared to the control case, i.e. in the absence of biopreservation.

To create correlation models with microbiological results, samples were considered as growth and validation samples in aggregate without being sorted into cases. The model construction for estimation of TMF in lettuce salad was performed using the linear regression algorithm with the partial least squares (PLS-R) method.

The models developed using the spectroscopic data did not show the expected and desired performance. Specifically, for MSI, the RMSE value for prediction equals 0.708 and 0.604 for the VideometerLab and VideometerLite devices respectively. The R^2 value equals 0.331 and 0.347 respectively for the two instruments mentioned above. Regarding the corresponding values for the model through FTIR data, the RMSE value for the prediction is equal to 0.847 and R^2 is equal to 0.125.

In conclusion, it was evident that the low storage temperature combined with modified atmosphere packaging contributed positively to the extension of the shelf-life of the product. However, no noticeable effect of *Lactiplantibacillus pentosus* on the growth of pathogens was observed. However, its presence did not compromise the safety of the product, nor its quality characteristics. On the contrary, spraying *Lactiplantibacillus pentosus* on samples showed an improved appearance and color of lettuce leaves, compared to samples with no bio-preservation. The models for the determination of TMF failed to yield a satisfactory result.

Scientific area: Food Microbiology

Keywords: lettuce, ready-to-eat salad, biopreservation, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, multispectral imaging (MSI)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής διατριβής πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον επιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Νίκο Χωριανόπουλο, για την εμπιστοσύνη, την καθοδήγηση και τη βοήθεια κατά την εκπόνησης της παρούσας μελέτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τον Καθηγητή κ. Παναγιώτη Σκανδάμη και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Κώστα Παπαδημητρίου, του Εργαστηρίου Ποιοτικού Ελέγχου & Υγιεινής Τροφίμων και Ποτών, για τον χρόνο που αφιέρωσαν ως μέλη της εξεταστικής επιτροπής.

Ευχαριστώ επίσης την κα Όλγα Παπαδοπούλου, Κύρια Ερευνήτρια του Ινστιτούτου Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων, ΕΛΓΟ – ΔΗΜΗΤΡΑ, για τη ουσιαστική συμβολή της στην υλοποίηση της παρούσας μελέτης, καθώς και για την συνεχή καθοδήγηση.

Δεν θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Αγγελική Δουκάκη, η οποία συνέβαλε με τον καλύτερο δυνατό τρόπο σε κάθε βήμα της μελέτης. Η παρουσία της ήταν ουσιαστική, κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας, αλλά και μετέπειτα στην συγγραφή και την ανάλυση των δεδομένων.

Ακόμη, ευχαριστώ όλο το προσωπικό του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων και τους συμφοιτητές μου για την άψογη συνεργασία.

Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένεια μου για την συνεχή στήριξη σε κάθε επίπεδο, αφού χωρίς αυτούς δεν θα είχα την ίδιες δυνατότητες να επιτύχω τους στόχους μου.

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

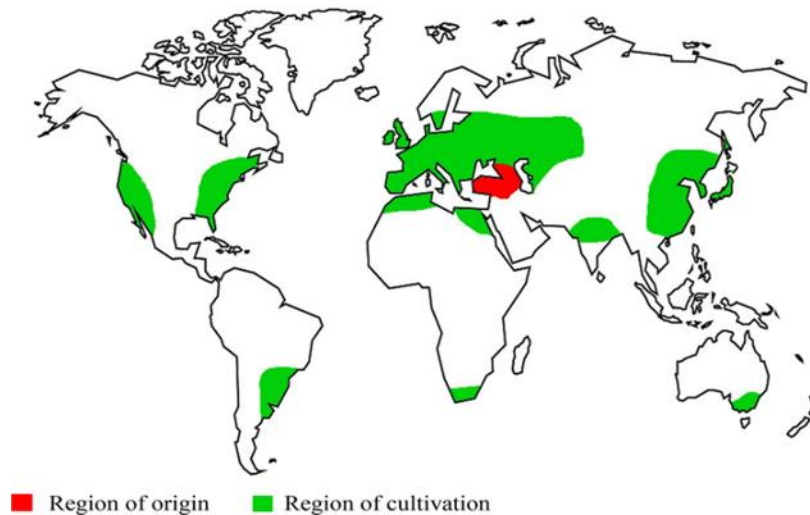
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	3
ABSTRACT.....	6
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	8
1. Εισαγωγή	11
1.1 Μαρούλι (<i>Lactuca sativa L.</i>).....	11
1.2 Έτοιμες προς κατανάλωση (ready-to-eat, RTE) σαλάτες.....	14
1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα και την ασφάλεια	16
1.3.1 Τύπος Προϊόντος.....	16
1.3.2 Διασταυρούμενη μόλυνση	17
1.3.3 Συσκευασία.....	18
1.3.4 Θερμοκρασία Αποθήκευσης.....	19
1.4 Μικροβιακή Χλωρίδα	20
1.4.1 <i>Listeria Monocytogenes</i>	23
1.4.2 <i>Escherichia coli</i>	24
1.5 Βιοσυντήρηση (Biopreservation).....	26
1.5.1 Προβιοτική Δράση.....	29
1.6 Μέθοδοι ανάλυσης για τον προσδιορισμό της αλλοίωσης.....	30
1.6.1 Πολυφασματική απεικόνιση (Multispectral Imaging, MSI).....	30
1.6.2 Φασματοσκόπια υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR)	32
Σκοπός.....	35
2. Υλικά και μέθοδοι.....	36
2.1 Πειραματικός σχεδιασμός.....	36
2.2 Προετοιμασία δειγμάτων	37
2.2.1 Προ-πείραμα	37
2.2.2 Εμβολιασμός και συσκευασία δειγμάτων.....	40

2.3 Μικροβιολογικές αναλύσεις	41
2.4 Μέτρηση pH	43
2.5 Οργανοληπτικός έλεγχος	44
2.6 Εφαρμογή πολυφασματικής απεικόνισης (Multispectral Imaging, MSI).....	44
2.7 Εφαρμογή φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR)	47
2.8 Ανάλυση φασματοσκοπικών δεδομένων	48
2.8.1 Γραμμική παλινδρόμηση με τη μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Regression – PLS-R)	48
3. Αποτελέσματα και συζήτηση	50
3.1 Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων	50
3.1.1 Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων των εμβολιασμένων δειγμάτων με <i>Listeria monocytogenes</i>	50
3.1.2 Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων των εμβολιασμένων δειγμάτων με <i>E.coli</i>	54
3.2 Αποτελέσματα μέτρησης pH	58
3.3 Αποτελέσματα οργανοληπτικής αξιολόγησης	59
3.4 Αποτελέσματα φασματοσκοπικών δεδομένων	61
3.4.1 Αποτελέσματα από τα δεδομένα της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI).....	61
3.4.2 Αποτελέσματα από τα δεδομένα της φασματοσκοπίας υπέρυθρου (FTIR)	66
4. Συμπεράσματα.....	70
5. Βιβλιογραφία	73

1. Εισαγωγή

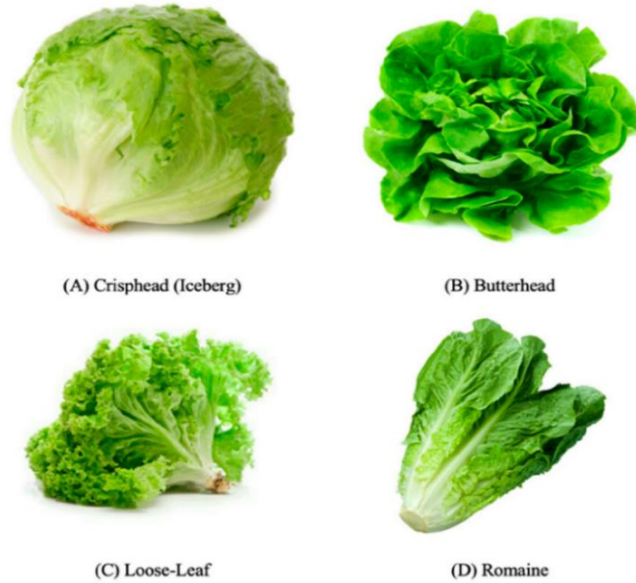
1.1 Μαρούλι (*Lactuca sativa* L.)

Το μαρούλι (*Lactuca sativa* L.) ανήκει στην οικογένεια Asteraceae και κατάγεται από τη Μεσόγειο. Στις αρχές του 2680 π.Χ., εμφανίστηκε για πρώτη φορά σε πρωτόγονα κείμενα ως φαρμακευτικό βότανο (Shi et al., 2022). Αργότερα, οι περιοχές καλλιέργειας μαρουλιού εξαπλώθηκαν από τη Μεσόγειο σε ολόκληρη την Ευρώπη, στην Αμερική και την Κίνα. Οι καταναλωτικές επιλογές και οι διάφορες προσπάθειες καλλιέργειας οδήγησαν σε αλλαγές από την αρχική μορφή του, σχετικά με στο μέγεθος, το σχήμα, το χρώμα, την υφή και τη γεύση, στην ανθεκτικότητα σε ασθένειες και έντομα, ενώ στις παραπάνω αλλαγές συνέβαλαν και η προσαρμογή σε διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές και περιβάλλοντα (Mou, 2008).



Εικόνα 1.1. Προέλευση και καλλιέργεια μαρουλιού ανά τον κόσμο (Hassan et al., 2021)

Υπάρχουν τυπικά επτά διαφορετικά είδη μαρουλιών, συμπεριλαμβανομένων των Cos (ή Romaine), Butterhead (ή Cutting), Stalk (ή Asparagus), Crisphead (ή Iceberg), Latin και Oilseed. Οι πιο συχνοί τύποι μαρουλιού είναι Crisphead, Butterhead, Looseleaf και Romaine (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2. Οι 4 πιο συχνοί τύποι μαρουλιού (Shi et al., 2022)

- a) Crisphead (ή Iceberg): σχηματίζει μια σφιχτή και πυκνή κεφαλή από σφαιρικά φύλλα που διπλώνουν μεταξύ τους και χαρακτηρίζεται από παχιά και τραγανά φύλλα, με ένα ευρύ φάσμα χρωμάτων από ανοιχτό έως και βαθύ πράσινο.
- b) Butterhead: εμφανίζει μια μικρή κεφαλή φύλλων όπως το Crisphead ,με πιο ελαφριά αναδίπλωση στα φύλλα. Τα εξωτερικά φύλλα είναι πιο σκουρόχρωμα πράσινα ενώ τα εσωτερικά είναι πιο ανοιχτόχρωμα, λόγω της έλλειψης φωτός. Τα φύλλα τους σκίζονται και αλλοιώνονται ευκολότερα από το Crisphead, ωστόσο η υφή τους είναι πιο ελκυστική για τον καταναλωτή.
- c) Loose-Leaf: σχηματίζει κεφαλές και παρουσιάζει πολλά φύλλα στο κέντρο του μαρουλιού, τα οποία έχουν λείες άκρες ή είναι κατσαρά. Ταξινομείται σε τρεις τύπους: πράσινο, κόκκινο και φύλλα βελανιδιάς. Τα χρώματα των φύλλων κυμαίνονται σε διάφορες αποχρώσεις ανάλογα την περιεκτικότητα των ανθοκυανινών και το φως που υπάρχει κατά την ανάπτυξή τους.
- d) Romaine (ή Cos ή *Lactuca sativa* L.): αναπτύσσεται σε πιο όρθια μορφή από τα τέσσερα κύρια είδη μαρουλιού και παρουσιάζει μακρόστενο σχήμα στα φύλλα. Τα εξωτερικά φύλλα είναι πιο σκούρα πράσινα, ενώ στο κέντρο τα φύλλα διπλώνονται σφιχτά και είναι πρασινωπά έως λευκά. Χαρακτηρίζεται από γλυκιά γεύση, σε σχέση με οποιαδήποτε άλλη ποικιλία μαρουλιού (Shi et al., 2022).

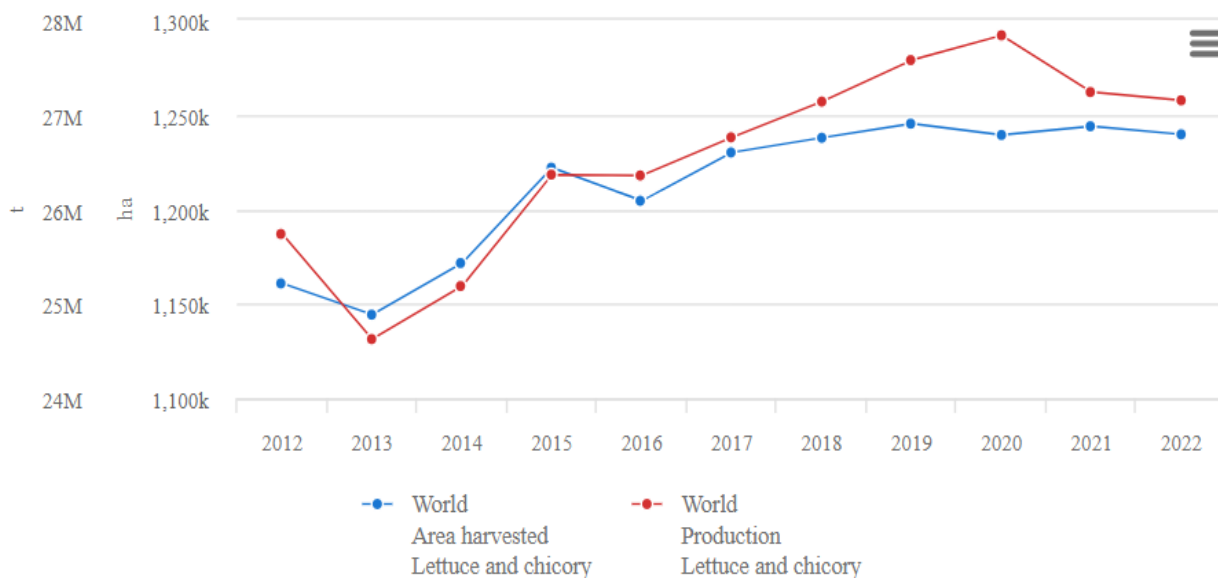
Το μαρούλι αποτελεί εξαιρετική πηγή βιταμινών, μετάλλων και βιοδραστικών ενώσεων, με σχετικά οφέλη για την υγεία. Είναι χαμηλό σε θερμίδες, με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό, περίπου στο 94–95%. Η θρεπτική αξία διαφέρει ανάλογα με τον κάθε τύπο μαρουλιού, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.1 (Shi et al., 2022) Είναι πλούσιο σε φυτικές ίνες, αντιοξειδωτικά, πολυφαινόλες, καροτενοειδή, ανθοκυανίνες, χλωροφύλλη, καθώς και σε πληθώρα βιταμινών. Επιπλέον, περιέχει μεγάλο ποσοστό μετάλλων όπως ασβέστιο, σίδηρο, μαγνήσιο, κάλιο και νάτριο. Η θρεπτική του αξία διαφέρει ανάλογα με το γονότυπο (Hassan et al., 2021).

Πίνακας 1.1 Περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά διαφόρων τύπων μαρουλιού, ανά 100 γραμμάρια προϊόντος (Μου, 2008)

Nutrient	Crisphead	Butterhead	Red leaf	Green leaf	Romaine	Stem
Water, g	95.6	95.6	95.6	95.1	94.6	
Energy, kcal	14	13	16	15	17	
Protein, g	0.90	1.35	1.33	1.36	1.23	0.60
Total lipid (fat), g	0.14	0.22	0.22	0.15	0.30	0.10
Carbohydrate, g	2.97	2.23	2.26	2.79	3.28	1.90
Dietary fiber, g	1.2	1.1	0.9	1.3	2.1	
Total sugar, g	1.76	0.94	0.48	0.78	1.19	
Calcium, mg	18	35	33	36	33	7
Iron, mg	0.41	1.24	1.20	0.86	0.97	2.00
Magnesium, mg	7	13	12	13	14	
Phosphorus, mg	20	33	28	29	30	31
Potassium, mg	141	238	187	194	247	
Sodium, mg	10	5	25	28	8	
Zinc, mg	0.15	0.20	0.20	0.18	0.23	
Copper, mg	0.025	0.016	0.028	0.029	0.048	
Manganese, mg	0.125	0.179	0.203	0.250	0.155	
Selenium, µg	0.1	0.6	1.5	0.6	0.4	
Vitamin A, IU*	502	3312	7492	7405	5807	33
Vitamin B-6, mg	0.042	0.082	0.100	0.090	0.074	
Vitamin C, mg	2.8	3.7	3.7	18.0	24.0	1.0
Vitamin E, mg	0.18	0.18	0.15	0.29	0.13	
γ-Tocopherol, mg	0.09	0.27	0.24	0.37	0.36	
Vitamin K, µg	24.1	102.3	140.3	173.6	102.5	
Folate, µg	29	73	36	38	136	
Lutein+zeaxanthin, µg	277	1223	1724	1730	2312	
Niacin, mg	0.123	0.357	0.321	0.375	0.313	0.500
Pantothenic acid, mg	0.091	0.150	0.144	0.134	0.142	
Riboflavin, mg	0.025	0.062	0.077	0.080	0.067	0.020
Thiamin, mg	0.041	0.057	0.064	0.070	0.072	0.030

*IU, International Unit. Source: USDA, Agricultural Research Service (USDA-ARS, 2005) except for stem lettuce (Lu, 2000).

Σύμφωνα με το Διεθνή Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας, το μαρούλι (*Lactuca sativa L.*) έχει καταταχθεί παγκοσμίως ως το φυλλώδες λαχανικό με τη μεγαλύτερη κατανάλωση και καλλιέργεια, ενώ η παραγωγή του ακολουθεί αυξητική τάση. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.3 τα τελευταία χρόνια, η συνολική έκταση που συγκομίστηκε μαρούλι ξεπερνά κατά πολύ τα 1,25 εκατομμύρια εκτάρια γης, με συνολική παραγωγή πάνω από 27 εκατομμύρια τόνους μαρουλιού παγκοσμίως (FAO, 2022).



Εικόνα 1.3 Ποσότητες παραγωγής/απόδοσης μαρουλιού και ραδικιού παγκοσμίως για την περίοδο 2012-2022 (FAO, 2022)

1.2 Έτοιμες προς κατανάλωση (ready-to-eat, RTE) σαλάτες

Η παγκόσμια αγορά έχει έρθει αντιμέτωπη με μια καταναλωτική τάση, η οποία τείνει συνδυάζει τις υγιεινές διατροφικές λύσεις με την εξοικονόμηση χρόνου. Έτσι, η κατανάλωση έτοιμων σαλατών σημειώνει αυξητική τάση σε όλο τον κόσμο και κυρίως στην Ευρώπη. Οι έτοιμες προς κατανάλωση σαλάτες είναι ελάχιστα επεξεργασμένα προϊόντα που προορίζονται να καταναλωθούν χωρίς πρόσθετες ενέργειες. Η εξεργασία που υπόκεινται, πριν βρεθούν στην αγορά, αφορά την απομάκρυνση των εξωτερικών και μαραμένων ή κατεστραμμένων φύλλων, τα οποία πλένονται, κόβονται, απομακρύνεται η υγρασία και στη συνέχεια συσκευάζονται. Η ελάχιστη τεχνολογική παρέμβαση στη δημιουργία έτοιμων προς κατανάλωση σαλατών αποσκοπεί στη διατήρηση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων. Ωστόσο, σχετίζεται με μικρότερη διάρκεια ζωής, η οποία κυμαίνεται από 5 έως 7 ημέρες το πολύ. Για το λόγο αυτό, έχει υιοθετηθεί η συσκευασία

τροποποιημένης ατμόσφαιρας (MAP), στοχεύοντας στην αύξηση χρόνου ζωής χωρίς την αλλοίωση των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών (Gupta & Madramootoo, 2017; Arienzo et al., 2020).



Εικόνα 1.4 Στάδια των ελάχιστα επεξεργασμένων φρούτων και λαχανικών, από τη συγκομιδή έως τη συσκευασία (M. I. Santos et al., 2023)

Τα φυλλώδη λαχανικά, σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, αναφέρονται ως τομέας προτεραιότητας που σχετίζεται άμεσα με την ασφάλεια των φρέσκων προϊόντων σε παγκόσμια κλίμακα. Αυτό οφείλεται στην αυξημένη ωμή κατανάλωσή τους, χωρίς περαιτέρω επεξεργασία και κατ' επέκταση στη συχνότητα των κρουσμάτων ασθενειών που σχετίζονται με αυτά. Έτσι, τα προϊόντα αυτά αναγνωρίζονται ως πιθανοί φορείς τροφιμογενών ασθενειών. Τα φυλλώδη λαχανικά απαρτίζονται από μια πλούσια μικροχλωρίδα και μπορούν να μολυνθούν από ανθρώπινα παθογόνα, σε διάφορες φάσεις του χειρισμού τους από την ανάπτυξη και τη συγκομιδή στο χωράφι έως την επεξεργασία και τη διανομή τους. Το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων έχει εκφράσει έντονη ανησυχία σχετικά με τις έτοιμες προς κατανάλωση σαλάτες για τη δημόσια υγεία.

Τυπικά βακτήρια που έχουν απομονωθεί από έτοιμες προς κατανάλωση σαλάτες είναι τα εξής: *Aeromonas spp.*, *Bacillus cereus*, *Brucella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Clostridium spp.*, *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Vibrio spp.* και *Yersinia spp.* (Gupta & Madramootoo, 2017; Garba et al., 2022; M. I. Santos et al., 2023).

Μικροοργανισμοί όπως *Listeria monocytogenes* και *Escherichia coli* O157:H7 είναι μερικοί από σημαντικότερους παθογόνους που προκαλούν ανησυχία για την ασφάλεια των τροφίμων. Σύμφωνα με τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας, στις αρχές του 2000, το *E. coli* βρέθηκε σε 10,7% δειγμάτων φυλλωδών λαχανικών, εκ των οποίων το 22,4% αφορούσε το μαρούλι, ενώ *L. monocytogenes* βρέθηκε σε μαρούλια σε ποσοστό 20%. (FAO/WHO, 2008)

Σύμφωνα με τον ευρωπαϊκό κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1441/2007, έχουν τεθεί κριτήρια τα οποία εξασφαλίζουν την ασφάλεια του προϊόντος. Συγκεκριμένα για τα φυλλώδη λαχανικά, ορίζεται η *L. monocytogenes* να μην υπερβαίνει τα 100 CFU/g. Αν και δεν υπάρχει κάποιο επίσημο όριο σχετικά με το *E.coli*, δίνονται κατευθυντήριες γραμμές ως μικροβιολογικό κριτήριο των έτοιμων προς κατανάλωση σαλατών (Arienza et al., 2020).

1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα και την ασφάλεια

Χαρακτηριστικά όπως η εμφάνιση, η υφή και η γεύση συνδέονται άμεσα με την ποιότητα των φρεσκοκομμένων προϊόντων, ενώ συχνά η ποιότητα και η ασφάλεια είναι δύο έννοιες που μπορούν να συσχετιστούν. Η εμφάνιση καθιστά των βασικό παράγοντα επιλογής ενός προϊόντος από τον καταναλωτή. Τα φρεσκοκομμένα προϊόντα, βάση καταναλωτικής ζήτησης, θα πρέπει να φαίνονται φρέσκα και να έχουν έντονο χρώμα χωρίς ελαττώματα. Η ασφάλεια του προϊόντος δεν δύναται να διαπιστωθεί με γυμνό μάτι σε ένα εμφανίσιμο προϊόν, γι' αυτό και λαμβάνει μεγαλύτερη προσοχή από τους ερευνητές (Francis et al., 2012).

Ωστόσο, ένα τρόφιμο χαρακτηρίζεται ως μη ασφαλές όχι μόνο όταν είναι επιβλαβές για την υγεία αλλά και όταν είναι ακατάλληλο για ανθρώπινη κατανάλωση σύμφωνα με τον Κανονισμό 178/2002 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και της Επιτροπής. Επομένως, ένα αλλοιωμένο τρόφιμο, συμπεριλαμβάνοντας την εμφάνιση τη γεύση και την οσμή, είναι ομοίως μη ασφαλές (Pamproukis et al., 2022).

1.3.1 Τύπος Προϊόντος

Κάθε τύπος προϊόντος παρέχει ένα μοναδικό συνδυασμό χαρακτηριστικών, τα οποία καθορίζουν το προϊόν και επηρεάζουν την αλλοίωσή του. Ακόμη και στην ίδια οικογένεια προϊόντος, οι διαφορετικές ποικιλίες παρουσιάζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά, όπως αναφέρθηκε παραπάνω για το μαρούλι. Χαρακτηριστικά όπως μέγεθος, χρώμα, γεύση,

υφή, θρεπτική αξία, αντοχή κ.α επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την ποιότητα του προϊόντος. Επιπρόσθετα, καθοριστικό ρόλο παίζει ο τύπος του προϊόντος στην επιβίωση παθογόνων μικροοργανισμών. Κάποιοι παράγοντες που επηρεάζουν στην ανάπτυξη παθογόνων είναι το pH, η παρουσία φυσικών αντιμικροβιακών ουσιών ή/και ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας αλλοίωσης και αλληλεπιδράσεις ρυθμού αναπνοής/συσκευασίας. Οι πλειονότητα των φυλλωδών λαχανικών παρουσιάζει pH μεγαλύτερο ή ίσο του 5.0 και συνεπώς ευνοείται ή ανάπτυξη τροφιμογενών βακτηρίων. Επιπλέον, τα φρεσκοκομμένα λαχανικά παρουσιάζουν μια μικροχλωρίδα η οποία περιλαμβάνει μεγάλους πληθυσμούς μικροοργανισμών όπως *Pseudomonas spp*, βακτηρία γαλακτικού οξέος (LAB) και Enterobacteriaceae (Francis et al., 2012).

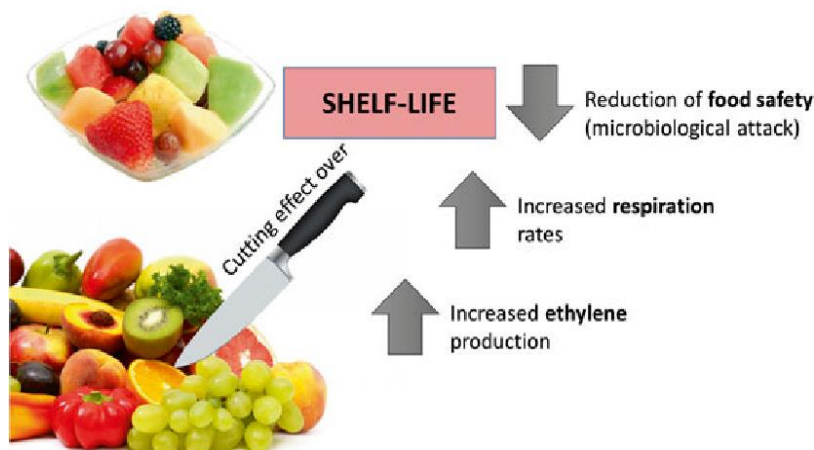
1.3.2 Διασταυρούμενη μόλυνση

Η μόλυνση των λαχανικών μπορεί να προκληθεί σε οποιοδήποτε στάδιο κατά τη διάρκεια της παραγωγικής αλυσίδας, με βασικότερη αιτία τη διασταυρούμενη μόλυνση. Είναι αξιοσημείωτο ότι η διασταυρούμενη μόλυνση κατατάχθηκε πρώτη στη λίστα των παραγόντων που συμβάλουν στις τροφιμογενείς επιδημίες (WHO, 2000). Οι πηγές επιμόλυνσης μπορούν να ταξινομηθούν σε δυο ομάδες, πριν και μετά τη συγκομιδή των προϊόντων.

Σχετικά με τις προ-συλλεκτικές πηγές επιμόλυνσης, το έδαφος μπορεί εν δυνάμει να είναι μια πηγή, λόγω μόλυνσης του νερού άρδευσης, του νερού που χρησιμοποιείται για τη χρήση εντομοκτόνων και μυκητοκτόνων, των κοπράνων των ζώων κ.α. (Balali et al., 2020). Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι το *E. coli* O157: H7 είναι πιθανό να μεταδοθεί στο μαρούλι μέσω του νερού άρδευσης, να παραμείνει σε αυτό καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του και κατά συνέπεια να μεταδοθεί σε όσους καταναλώσουν το προϊόν (Bhunia, 2019).

Οι μετά-συλλεκτικές πρακτικές μπορούν επίσης να επηρεάσουν τόσο την ποιότητα, όσο και την ασφάλεια του προϊόντος. Η πλύση τους με μολυσμένο νερό, ο λανθασμένος χειρισμός τεμαχισμού ή η αποθήκευση τους σε δοχεία μη αποστειρωμένα μπορεί να επιφέρει τη μεταφορά παθογόνων μικροοργανισμών και την υποβάθμιση της ποιότητας (Balali et al., 2020). Όσον αφορά τον τεμαχισμό των έτοιμων προς κατανάλωση σαλατών, προκαλείται καταστροφή των επιφανειακών κυττάρων και κατ' επέκταση αύξηση του ρυθμού αναπνοής και της παραγωγής αιθυλενίου. Επιπλέον, είναι πιθανό να αυξηθούν οι φαινόλες, ενώ ταυτόχρονα η αποικοδόμηση των λιπιδίων της μεμβράνης μπορεί να

επιφέρει απώλεια λιπιδικών συστατικών και διαμερισματοποίηση των κυττάρων. Αποτέλεσμα αυτού είναι η αλληλεπίδραση ενζύμων και υποστρωμάτων με επιπτώσεις στην ποιότητα του προϊόντος.



Εικόνα 1.5 Επίδραση της κοπής φυτικού ιστού κατά τη διάρκεια ζωής των φρέσκων φρούτων και λαχανικών (Velderrain-Rodríguez et al., 2015)

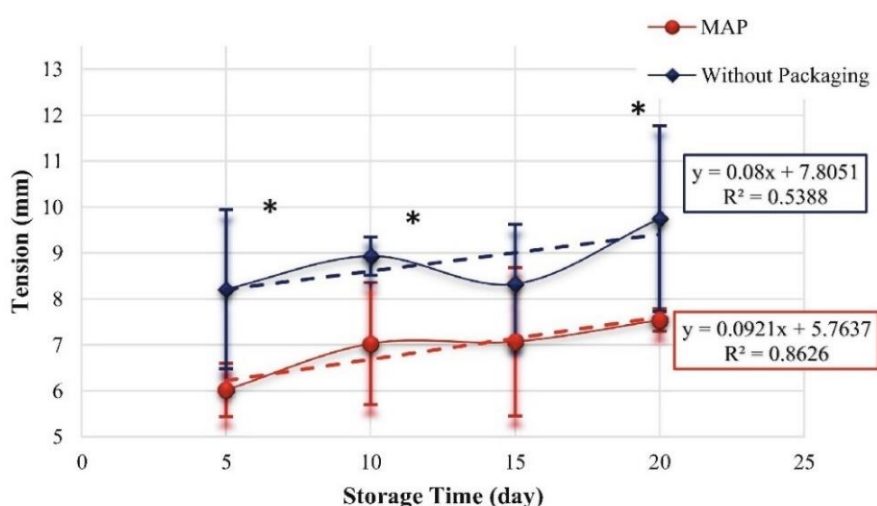
Μέσω των διαδικασιών κοπής απελευθερώνονται θρεπτικά συστατικά ή αντιμικροβιακές ουσίες, τα οποία επηρεάζουν την ανάπτυξη παθογόνων. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί παρουσιάζουν αργή ανάπτυξη σε άθικτα ή μη τραυματισμένα προϊόντα (Francis et al., 2012; Velderrain-Rodríguez et al., 2015). Είναι αξιοσημείωτο ότι σύμφωνα με μελέτες, η μεταφορά παθογόνων μικροοργανισμών γίνεται σε μεγαλύτερα ποσοστά από εξοπλισμό σε φυλλώδη λαχανικά και συγκεκριμένα στο μαρούλι, συγκριτικά με τη μεταφορά των ίδιων παθογόνων από το μαρούλι στο μαχαίρι (Zilelidou et al., 2015; Yi et al., 2020).

1.3.3 Συσκευασία

Η συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Modified Atmospheric Packaging, MAP) έχει εδραιωθεί τα τελευταία χρόνια για τις έτοιμες προς κατανάλωση σαλάτες. Περιλαμβάνει την ενεργητική ή παθητική τροποποίηση του αέρα εντός της συσκευασίας με ένα μείγμα οξυγόνου (O_2), διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και αζώτου (N_2) για τη ρύθμιση των φυσιολογικών και βιοχημικών αποκρίσεων του προϊόντος. Η συσκευασία αυτή παρέχει στον καταναλωτή αναλλοίωτη τη φρεσκάδα, παρατείνοντας τη διάρκεια ζωής του προϊόντος. Αυτό οφείλεται στην μείωση του ρυθμού αναπνοής, της διαπνοής, του οξειδωτικού, την παραγωγή αιθυλενίου και τις ενζυμικές αντιδράσεις. Η χρήση οξυγόνου είναι σε χαμηλά επίπεδα ή απουσιάζει, ενώ η συσκευασία είναι εμπλουτισμένη με διοξείδιο

του άνθρακα (CO₂). Εκτός από την επίδραση στην ποιότητα του προϊόντος, η συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας, δύναται να επηρεάζει την επιβίωση παθογόνων μικροοργανισμών. Το MAP αποσκοπεί στη δημιουργία μια ιδανικής ατμόσφαιρας, η οποία συνήθως διαχέεται εντός της συσκευασίας πριν από τη σφράγιση της. Η σύνθεση των αερίων ποικίλει ανάλογα τον τύπο του προϊόντος (Francis et al., 2012; Soltani Firouz et al., 2021). Ορισμένες συνθέσεις αερίων για φρεσκοκομμένα λαχανικά έχουν προταθεί από τους Karetanakou et al. (2019) και είναι οι εξής: i) 0% O₂/ 20% CO₂/ 80% N₂, ii) 5% O₂/ 15% CO₂/ 80% N₂, iii) 10% O₂/ 10% CO₂/ 80% N₂, iv) 15% O₂/ 5%CO₂/ 80% N₂, v) 20% O₂/ 0%CO₂/ 80% N₂.

Ταυτόχρονα, η συσκευασία MA έχει ευεργετική επίδραση τόσο στις μηχανικές ιδιότητες του μαρουλιού, όπως την αντοχή, τη σκληρότητα κ.α., αλλά και στη συνολική εμφάνιση του προϊόντος (μαύρισμα, συρρίκνωση φύλλων, υφή φύλλων) (Soltani Firouz et al., 2021).



Εικόνα 1.6 Δοκιμή εφελκυσμού φύλλου μαρουλιού σε διαφορετική περίοδο αποθήκευσης. (Οι γραμμές αντιπροσωπεύουν το διάστημα εμπιστοσύνης 95%, * αντιπροσωπεύει σημαντικές διαφορές μεταξύ του τύπου αποθήκευσης στο $P < 0,05$) (Soltani Firouz et al., 2021)

1.3.4 Θερμοκρασία Αποθήκευσης

Η διατήρηση της ψυκτικής αλυσίδας, κατά τη μεταφορά και την αποθήκευση των φρεσκοκομμένων λαχανικών, διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην ποιότητα και την ασφάλεια του προϊόντος. Η θερμοκρασία συνδέεται άμεσα με το ρυθμό αναπνοής, την διαπερατότητα της συσκευασίας και κατά συνέπεια την ατμόσφαιρα εντός της συσκευασίας. Σύμφωνα με τους Tsironi et al. (2017), η μη τήρηση της ψυκτικής αλυσίδας, πέραν της μικροβιακής επιβάρυνσης, επιφέρει αρνητικά αποτελέσματα τόσο στο χρώμα φρεσκοκομμένης σαλάτας πράσινου μαρουλιού, αλλά και σημαντική υποβάθμιση της σκληρότητας και της υφής των

φύλλων. Η κρισιμότερη επιρροή της μη τήρησης χαμηλών θερμοκρασιών έγκειται στην ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών (Francis et al., 2012). Ψυχρότροφοι μικροοργανισμοί, όπως η *L. monocytogenes*, είναι ικανοί να αναπτύσσονται σε χαμηλές θερμοκρασίες αποθήκευσης ($\leq 4^{\circ}\text{C}$), ενώ η ανάπτυξη των μεσόφιλων παθογόνων (*Salmonella spp* και *E. Coli* O157:H7) περιορίζεται σε ελεγχόμενες χαμηλές θερμοκρασίες αποθήκευσης. Επιπλέον, σύμφωνα με τους Zhou et al. (2022), η κατάχρηση θερμοκρασίας (8–12 °C) σε έτοιμες προς κατανάλωση σαλάτες λαχανικών μπορεί να αποφέρει μείωση της διάρκειας ζωής κατά 25–50%. Επομένως, η διασφάλιση της ψυκτικής αλυσίδας σε όλες τις φάσεις είναι απαραίτητη για την ασφάλεια και την ποιότητα φρεσκοκομμένων φυλλωδών λαχανικών (Francis et al., 2012).

1.4 Μικροβιακή Χλωρίδα

Η σύνθετη μικροβιακή χλωρίδα αλλοίωσης των φυλλωδών λαχανικών περιλαμβάνει κατά κύριο λόγο το γένος *Pseudomonas*, βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB), την οικογένεια Enterobacteriaceae, ζύμες και μύκητες (Francis et al., 2012; Tsironi et al., 2017). Πιο συγκεκριμένα, κυρίαρχος μικροβιακός πληθυσμός είναι τα είδη που ανήκουν στις στο γένος *Pseudomonas spp* και την οικογένεια Enterobacteriaceae. Επιπλέον ορισμένα είδη του γαλακτικού οξέος και είδη ζυμών και μυκήτων έχουν εντοπιστεί στα ελάχιστα επεξεργασμένα λαχανικά (Ragaert et al., 2007). Ταυτόχρονα, εκτός των άλλων, οι έτοιμες προς κατανάλωση σαλάτες θα μπορούσαν να παρουσιάσουν διαφορους παθογόνους μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*. (Łepecka et al., 2022). Συγκεκριμένα, η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) και το Ευρωπαϊκό Κέντρο Πρόληψης και Ελέγχου Νόσων (ECDC) ανέφεραν τη λοίμωξη από *Escherichia coli*-STEC που παράγει τοξίνες Shiga και τη λιστερίωση, ως δυο από τις τη συχνότερες τροφιμογενείς λοιμώξεις, με υψηλό ποσοστό νοσηλευόμενων περιπτώσεων το 2020 (Boelaert et al., 2021).

Pseudomonas spp.: είναι κυρίαρχη αλλοίωση, σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες σε διάφορα φυλλώδη λαχανικά, όπως το σπανάκι, το μαρούλι ή το λάχανο (Lopez-Velasco et al., 2011; Tsironi et al., 2017; Kapetanakou et al., 2019)

Το γένος *Pseudomonas* είναι αρνητικοί κατά Gram βάκιλοι, σε σχήμα ράβδου, μη σπορογόνοι, που κινούνται με τη βοήθεια ενός (π.χ. *P. aeruginosa*, *P. stutzeri*, *P.*

oryzihabitans) ή περισσότερων μαστιγίων (π.χ. *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. luteola*). Συνήθως συναντάται στο έδαφος, το γλυκό νερό, το θαλάσσιο περιβάλλον κ.λπ., αλλά έχει επίσης απομονωθεί και από κλινικά εργαλεία, ασηπτικά διαλύματα, καλλυντικά και ιατρικά προϊόντα. Αρκετά είδη το γένους είναι ψυχοτροφικά, ενώ μπορεί να είναι φθορίζοντα ή μη φθορίζοντα και ευθύνονται για την κύρια αλλοίωση κρύων τροφίμων (Franzetti & Scarpeluni, 2007; Wisplinghoff & Seifert, 2010; Ruiz-Roldán et al., 2021).

Τα πιο αντιπροσωπευτικά είδη στα ελάχιστα επεξεργασμένα λαχανικά είναι τα *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chichorii* και *P. maltophilia*. Εκτός από τις ενζυμικές αντιδράσεις, η φθορίζουσα ψευδομονάδες είναι υπεύθυνες για τη σήψη των φυτικών ιστών σε έτοιμα προς κατανάλωση λαχανικά. Προκαλούν ταχεία αντίδραση χρωματικής αλλοίωσης στην επιφάνεια κοπής του μαρουλιού και εντονότερη σήψη από εκείνες που προκαλούν άλλα βακτήρια. Η *P. chichorii* προκαλεί καταστροφική ασθένεια μέσω γυαλιστερών, καφέ κηλίδων στα εσωτερικά μέρη των φύλλων μαρουλιού. Η *P. aeruginosa* αποτελεί υψίστης σημασίας είδος ψευδομονάδας που συναντάται στο μαρούλι, καθώς είναι ένα ευκαιριακό παθογόνο για τον ανθρώπινο οργανισμό, που χαρακτηρίζεται από μεγάλη αντοχή στα αντιμικροβιακά (Federico et al., 2015; Ruiz-Roldán et al., 2021).

Enterobacteriaceae: μεγάλη οικογένεια βακτηρίων, τα οποία χαρακτηρίζονται ως αρνητικά κατά Gram, σε σχήμα ράβδου, προαιρετικά αναερόβια, κινητικά ή μη κινητικά και δεν σχηματίζουν σπόρια (D'Agostino & Cook, 2016; Osaili et al., 2018).

Το γένος των εντεροβακτηριδίων μπορούν να προκαλέσουν ένα ευρύ φάσμα ασθενειών, όπως λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, γαστρεντερίτιδα, μηνιγγίτιδα, πνευμονία, σηψαιμία, αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο κ.α. Όλα τα είδη του γένους δεν θεωρούνται παθογόνα, ορισμένα κατατάσσονται στα ευκαιριακά παθογόνα. Στο περιβάλλον μπορούν να βρεθούν οπουδήποτε, ενώ έχουν απομονωθεί το έδαφος, το νερό, τα φυτά και το γαστρεντερικό σύστημα ζώων και ανθρώπων. Λόγω του ευρέως φάσματος ύπαρξης ζωής των ειδών μπορούν εύκολα να επιμολύνουν την τροφική αλυσίδα. Συχνά είδη συσχετισμένα με λαχανικά ελάχιστης επεξεργασίας είναι τα εξής: *Enterobacter*, *Pantoea* και *Rahnella*, εκτός των άλλων περιλαμβάνονται σημαντικοί τροφιμογενείς παθογόνοι μικροοργανισμών, όπως *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, συμπεριλαμβανομένου του *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella* spp. και *Cronobacter* spp. Έτσι, τα είδη των Enterobacteriaceae χρησιμοποιούνται συχνά στη βιομηχανία τροφίμων

ως δείκτες ελέγχου της αποτελεσματικότητας των πρακτικών υγιεινής και των παραγωγικών διαδικασιών (D'Agostino & Cook, 2016; T. S. Santos et al., 2020).

Lactic Acid Bacteria (LAB): Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB) αποτελούν μια ποικιλόμορφη ομάδα μικροοργανισμών, γνωστή για την ικανότητά τους να ζυμώνουν υδατάνθρακες σε γαλακτικό οξύ.

Τα LAB είναι θετικά κατά Gram, αρνητικά στην καταλάση και χαρακτηρίζονται κυρίως από την ανοχή τους στα οξέα και τη μορφολογία τους, συνήθως είναι μη κινητικά κοκκία ή ράβδοι. Αν και ορισμένα είδη σε γένη όπως ο *Streptococcus*, ο *Enterococcus*, ο *Lactococcus* και το *Carnobacterium* μπορεί να ενέχουν παθογόνους κινδύνους, η πλειονότητα των LAB θεωρείται μη παθογόνος και χαρακτηρίζονται ως GRAS (Generally Recognized as Safe).

Λόγω της ικανότητά τους σε μεταβολική ποικιλομορφία και προσαρμοστικότητα, κατοικούν σε διάφορα σημεία, συμπεριλαμβανομένων των φυτικών υλικών, των γαλακτοκομικών προϊόντων, του κρέατος, των δημητριακών, του γαστρεντερικού σωλήνα και του εδάφους. Κυριαρχούν γένη όπως τα *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* και *Streptococcus*, ενώ έχουν εισαχθεί πρόσθετα γένη όπως τα *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* και *Weisella*, αντανakλώντας τα ποικίλα μορφολογικά και μεταβολικά χαρακτηριστικά των LAB.

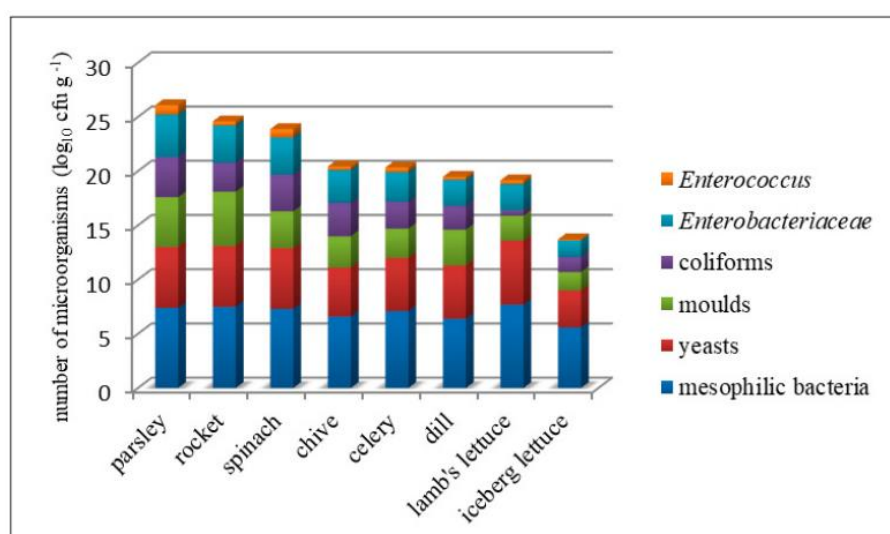
Παρά τον κρίσιμο ρόλο τους στη ζύμωση των τροφίμων, ορισμένα ψυχρότροφα είδη LAB, όπως τα *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc gasicomitatum*, *Lactobacillus curvatus* και *Lactobacillus sakei*, μπορούν να οδηγήσουν σε ανεπιθύμητα αποτελέσματα στα συσκευασμένα τρόφιμα. Αυτές οι επιδράσεις περιλαμβάνουν ξινίλες, αλλοιωμένες γεύσεις, παραγωγή αερίων, αποχρωματισμό, σχηματισμό γλίτσας και μείωση του pH, κυρίως σε έτοιμες προς κατανάλωση σαλάτες, φρέσκα κρέατα και σύνθετα τρόφιμα (Mozzi, 2016; Webb et al., 2022). Σύμφωνα με τους Pothakos et al., 2012, τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος ήταν ιδιαίτερα διαδεδομένα στο τέλος της διάρκειας ζωής στο ράφι σε διάφορα δείγματα έτοιμων προς κατανάλωση (RTE) σαλατών λαχανικών.

Ζύμες και μύκητες: Οι τροφιμογενείς ζύμες και μύκητες, που περιλαμβάνουν εκατοντάδες είδη, παρουσιάζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά και επιπτώσεις στα προϊόντα διατροφής.

Ευδοκιμούν σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες, απαιτώντας αερόβιες συνθήκες, ανέχονται επίπεδα pH από 2 έως πάνω από 9 και θερμοκρασίες μεταξύ 10-35°C.

Οι ζύμες και οι μύκητες αλλοιώνουν σημαντικά τα τρόφιμα σε οποιοδήποτε στάδιο, από καλλιέργειες αγρού έως επεξεργασμένα είδη, προκαλώντας φυσικές ζημιές στα τρόφιμα, όπως κηλίδες, σημεία σήψης, γλίτσα και ανάπτυξη μούχλας. Επιπλέον, παράγουν δυσάρεστες γεύσεις και οσμές, επηρεάζοντας την ποιότητα των τροφίμων. Ορισμένοι μύκητες και δυνητικά ζύμες παράγουν μυκοτοξίνες, σταθερές ενώσεις που επιμένουν κατά την επεξεργασία και το μαγείρεμα των τροφίμων, θέτοντας σοβαρές απειλές για την υγεία. Επιπλέον, μπορούν να προκαλέσουν αλλεργικές αντιδράσεις ή λοιμώξεις, κυρίως σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα (Tournas et al., 2001).

Η υψηλότερη ανάπτυξη ζυμών στις σαλάτες μπορεί να επηρεαστεί από τις διαδικασίες χειρισμού κατά την κοπή και τη συσκευασία, καθώς ο εκτεταμένος χειρισμός αυξάνει τον κίνδυνο μόλυνσης. Η αλλοίωση από την ανάπτυξη μυκήτων δεν είναι ένα σημαντικό ζήτημα στις έτοιμες προς κατανάλωση σαλάτες, αν και οι πιθανοί κίνδυνοι για την υγεία, δεν μπορούν να παραλειφθούν (Oliveira et al., 2010; Tournas, 2005).



Εικόνα 1.7 Αριθμός μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από φυλλώδη προϊόντα (Kowalska & Szczech, 2022)

1.4.1 *Listeria Monocytogenes*

Η *Listeria monocytogenes* έχει εμπλακεί σε μεγάλες τεκμηριωμένες τροφιμογενείς επιδημίες και σποραδικά κρούσματα σε έτοιμα προς κατανάλωση (RTE) τρόφιμα. Έτσι, η αξιολόγηση και η διαχείριση του κινδύνου της, σε σαλάτες μαρουλιού RTE καθίσταται ιδιαίτερα σκόπιμη, λόγω της συσχέτισης μεταξύ λαχανικών και κρουσμάτων λιστερίωσης,

των σοβαρών συνεπειών της νόσου και της γενικής ανησυχίας για την παρουσία της *L. monocytogenes* στα τρόφιμα (Carrasco et al., 2010; Webb et al., 2022).

Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα θετικό κατά Gram, προαιρετικά αναερόβιο, μη σπορογόνο, ραβδωτό βακτήριο που είναι θετικό στην καταλάση. Αναπτύσσεται σε χαμηλές θερμοκρασίες, όπως οι θερμοκρασίες ψύξης. Είναι ένα ανθεκτικό βακτήριο σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες, χαρακτηριστικό που επιτρέπει την επιβίωση σε αντίξοες συνθήκες περισσότερο από τα περισσότερα μη σπορογόνα βακτήρια που σχετίζονται με τις τροφιμογενείς ασθένειες.

Η *L. monocytogenes* έχει συχνά απομονωθεί από περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων, κυρίως σε δροσερά και υγρά περιβάλλοντα. Απαντάται σε μια πληθώρα τροφίμων ώμων ή μαγειρεμένων τροφίμων, λόγω μόλυνσης μετά την επεξεργασία. Τέτοια τρόφιμα πιθανώς είναι ωμό και παστεριωμένο γάλα, τυριά, παγωτό, ωμά λαχανικά, ζυμωμένα ωμά κρέατα και μαγειρεμένα λουκάνικα, ωμά και μαγειρεμένα πουλερικά, ωμά κρέατα, ωμά και καπνιστά θαλασσινά (WHO/ FAO, 2004; D'Agostino & Cook, 2016; Webb et al., 2022).

Το 1981, έγινε γνωστό ότι το *L. monocytogenes* είναι μια τροφιμογενής ασθένεια που συνδέεται με πληθώρα τροφίμων. Αν και δεν αποτελεί την πιο κοινή τροφιμογενή ασθένεια, κατέχει το υψηλότερο ποσοστό θνησιμότητας λόγω των μοναδικών παραγόντων ιογένεσης. Η *L. monocytogenes* είναι πιθανό να βρεθεί στο έδαφος, το νερό και τη βλάστηση, ενώ το βακτήριο μπορεί επίσης να βρεθεί στον ανθρώπινο πεπτικό σωλήνα. Το βακτήριο μεταδίδεται μέσω των κοπράνων ή της στοματικής οδού. Οι πληθυσμιακές ομάδες που διακατέχουν υψηλό κίνδυνο μόλυνσης από *L. monocytogenes* είναι έγκυες γυναίκες, βρέφη, ανοσοκατεσταλμένα άτομα και ηλικιωμένους. Με τη μόλυνση από *L. monocytogenes* μπορεί να προκληθεί αμνιονίτιδα, σηψαιμία, αποβολή σε έγκυες γυναίκες, κοκκιωμάτωση του νεογνού (*granulomatosis infantiseptica*) και μηνιγγίτιδα. Ορισμένοι ασθενείς, χωρίς προηγούμενα νοσήματα, μπορεί να εμφανίσουν συμπτώματα που μοιάζουν με γρίπη ή γαστρεντερίτιδα, όπως πυρετό, διάρροια, πονοκέφαλο, ρίγη, ναυτία, έμετο, μυαλγίες, ενώ ορισμένοι μπορεί να είναι εντελώς ασυμπτωματικοί (Rogalla & Bomar, 2023)

1.4.2 *Escherichia coli*

Επιδημίες *E. coli* O157:H7 έχουν εμπλακεί σε προϊόντα, ιδίως πράσινα φυλλώδη λαχανικά και κατέχει την πρώτη θέση στην κατάταξη κινδύνου των νωπών προϊόντων στις Ηνωμένες Πολιτείες σε μια πρόσφατη μελέτη (Pang et al., 2017).

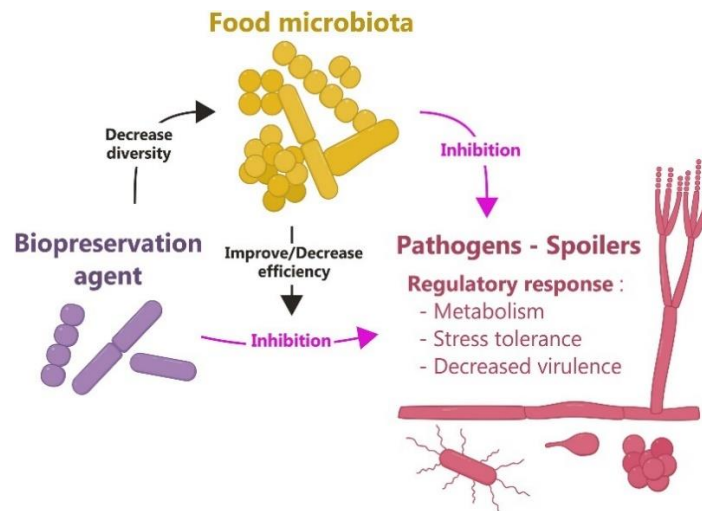
Η *Escherichia coli* (*E. coli*) είναι ένα αρνητικό κατά Gram, ραβδοειδές, προαιρετικό αναερόβιο βακτήριο. Πληθώρα στελεχών αποικίζει αβλαβώς, ως φυσιολογικής χλωρίδα, στον εντερικό σωλήνα ανθρώπων και ζώων. Ωστόσο, ορισμένα στελέχη αναγνωρίζονται ως παθογόνα και κατηγοριοποιούνται με βάση τις οροομάδες, τους μηχανισμούς παθογένειας, τα κλινικά συμπτώματα ή τους παράγοντες ιογένεσης. Στα παθογόνα στελέχη *E. coli* κατατάσσεται το εντεροαιμορραγικό *E. coli* (EHEC), το οποίο παράγει τοξίνες Shiga (Stxs) και συχνά αναφέρεται ως EHEC/STEC. Ανθρώπινες ασθένειες συνδέονται συχνά με ορότυπους του EHEC, όπως οι O26:H11, O91:H21, O111:H8, O157:NM και O157:H7. Το *E. coli* O157:H7 αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα τροφιμογενή παθογόνα (Lim et al., 2010; Estrada-Garcia & Tarr, 2023).

Η λοίμωξη από *E. coli* O157:H7 σε πολλές περιοχές του κόσμου αποτελεί μείζον πρόβλημα δημόσιας υγείας. Στον άνθρωπο, η λοίμωξη από *E. coli* O157:H7 μπορεί να παρουσιάσει ένα ευρύ φάσμα κλινικών περιπτώσεων, οι οποίες κυμαίνονται από ασυμπτωματικές περιπτώσεις έως και θάνατο. Συχνότερα, εμφανίζονται περιπτώσεις αιματηρή διάρροιας (HC) χωρίς περαιτέρω επιπλοκές. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η νόσος μπορεί να εξελιχθεί σε απειλητικά για τη ζωή επακόλουθα. Αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης σοβαρών κλινικών συμπτωμάτων, όπως αιμολυτικό-ουραιμικό σύνδρομο (HUS) ή θρομβοπενική πορφύρα (TTP), παρουσιάζουν οι ηλικιωμένοι και τα παιδιά. Το *E. coli* O157:H7 μπορεί να επιβιώσει και να παραμείνει σε διάφορα περιβάλλοντα, όπως το έδαφος, το νερό και τα τρόφιμα. Ο συχνότερος τρόπος μετάδοσης αφορά την κατανάλωση μολυσμένων τροφίμων και νερού, ενώ μπορεί επίσης να μεταδοθεί από άνθρωπο σε άνθρωπο ή από ζώο σε άνθρωπο (Lim et al., 2010).

Σχετικά με τα φυλλώδη λαχανικά, η μόλυνση τους από *E. coli* αυξάνεται κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, μετά τη συγκομιδή. Παράλληλα, μέσω των πρακτικών κοπής αυξάνεται η πιθανότητα διασταυρούμενης βακτηριακής μόλυνσης. Οι πληθυσμοί του *E. coli* O157:H7 αποδεδειγμένα αυξάνονται ραγδαία εντός τεσσάρων ωρών σε μαρούλι (romaine) που δέχτηκε μηχανική επεξεργασία. Ωστόσο, η ψύξη των λαχανικών στους 4°C ή λιγότερο μπορεί να επιβραδύνει ή να αποτρέψει την ανάπτυξη του *E. coli* O157:H7 (EFSA, 2011).

1.5 Βιοσυντήρηση (Biopreservation)

Η βιοσυντήρηση είναι μια βιώσιμη προσέγγιση που στοχεύει στην ενίσχυση της ασφάλειας των τροφίμων και στην παράταση της διάρκειας ζωής, χρησιμοποιώντας ωφέλιμους μικροοργανισμούς ή τα υποπροϊόντα τους, χωρίς να επηρεάζει αρνητικά τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και τις θρεπτικές ιδιότητες των τροφίμων (Singh, 2018; Ibrahim et al., 2021; Borges et al., 2022).



Εικόνα 1.8 Ο μηχανισμός της βιοσυντήρησης τροφίμων (Borges et al., 2022)

Η ιδέα της βιοσυντήρησης βασίστηκε αρχικά στις πρακτικές ζύμωσης τροφίμων και συσχετίστηκε με τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση, όπως τυριά, γιαούρτια και λουκάνικα. Ωστόσο, το πεδίο εφαρμογής του έχει επεκταθεί για να συμπεριλάβει προϊόντα που δεν έχουν υποστεί ζύμωση, όπως τα θαλασσινά, το ωμό κρέας και τα τρόφιμα φυτικής προέλευσης. Ειδικότερα, η βιοσυντήρηση φυτικών προϊόντων στοχεύει μικροοργανισμούς όπως ζύμες, μύκητες, σπορογόνα βακτήρια και παθογόνα βακτήρια όπως η *L. monocytogenes*.

Συχνότερα, τα είδη που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων με σκοπό τη βιοσυντήρηση είναι βακτήρια του γαλακτικού οξέος και κυρίως τα γένη *Lactococcus*, *Lactobacillus* και *Carnobacterium* (Borges et al., 2022). Τα LAB διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη βιοσυντήρηση των τροφίμων, λόγω της ασφάλειάς τους και της προσαρμοστικότητάς τους. Τα LAB παράγουν αντιμικροβιακές ενώσεις, όπως οργανικά οξέα (γαλακτικό, κιτρικό, οξικό, φουμαρικό και μηλικό οξύ), υπεροξειδίου του υδρογόνου, CO₂, διακετύλιο, αιθανόλη, ρεουτερίνη, ακεταλδεΐδη, ακετοΐνη, αμμωνία, βακτηριοκίνες, ανασταλτικές ουσίες που μοιάζουν με βακτηριοκίνες (BLIS) και άλλους

σημαντικούς μεταβολίτες, οι οποίοι έχουν ισχυρή ανταγωνιστική δράση έναντι πολλών μικροοργανισμών. Μελέτες έχουν δείξει την αποτελεσματικότητα των LAB στην αναστολή της ανάπτυξης παθογόνων σε διάφορα προϊόντα διατροφής, συμπεριλαμβανομένων φρέσκων φρούτων, λαχανικών και σαλατών (Πίνακας 1.2). Παράλληλα, τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος (LAB) χαρακτηρίζονται ως ασφαλή (Generally Recognized As Safe, GRAS) από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) και ως αναγνωρισμένο τεκμήριο ασφάλειας (Qualified Presumption of Safety, QPS) από την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) (Trias et al., 2008; Junnarkar et al., 2019; Agriopoulou et al., 2020; Ramos et al., 2020).

Αν και η πολυπλοκότητα και η ποικιλομορφία των μικροβιακών πληθυσμών τίθεται ως εμπόδιο στην ευρεία χρήση της βιοσυντήρησης από τη βιομηχανία τροφίμων, η χρήση των LAB και των βιοδραστικών τους ενώσεων αντιπροσωπεύει μια πολλά υποσχόμενη οδό για τη βελτίωση της ποιότητας και της ασφάλειας των τροφίμων μέσω της βιοσυντήρησης. Αξιοποιώντας τις φυσικές αντιμικροβιακές ιδιότητες του LAB και των βακτηριοσινών, η βιομηχανία τροφίμων μπορεί να καλύψει τη ζήτηση των καταναλωτών για ασφαλέστερα, πιο φρέσκα και ελάχιστα επεξεργασμένα προϊόντα. Ταυτόχρονα, μειώνει την εξάρτηση από πρόσθετα και θερμικές επεξεργασίες, γεγονός που φαίνεται να αποζητούν οι καταναλωτές τη σημερινή εποχή (Borges et al., 2022; Webb et al., 2022).

Πίνακας 1.2 Ορισμένες μελέτες βιοσυντήρησης φυλλωδών λαχανικών με τη χρήση LAB

Food matrix	LAB	Reference
Iceberg lettuce (and Golden Delicious apple)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293, <i>Ln. fallax</i> ATCC 700006, <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 15577, <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454, <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCFB 1403, <i>Lb. plantarum</i> ATCC 14917, <i>Lb. collinoides</i> ATCC 27612, <i>Lb. buchnerii</i> ATCC 4005, <i>Lb. brevis</i> ATCC 8287, <i>Lb. sakei</i> subsp. <i>sakei</i> ATCC 31063, <i>Lb. delbruekii</i> subsp. <i>lactis</i> NCFB 970, <i>Pediococcus dextrinicus</i> ATCC 33087, <i>Pediococcus parvulus</i> ATCC 19371	(Trias et al., 2008)
Lamb's lettuce	<i>Lactobacillus casei</i> V4B4, <i>Lb. plantarum</i> V7B3	(Siroli et al., 2015)
Iceberg lettuce and packed vegetables (rocket, spinach, parsley)	<i>Pediococcus pentosaceus</i> DT016	(Ramos et al., 2020)
Cabbage	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> CICC 6257	(Dong et al., 2020)
Fresh-cut curly endive	<i>Lactobacillus curvatus</i>	(Truchado et al., 2020)
Fresh vegetables	<i>Lactobacillus plantarum</i> AG40V	(Junnarkar et al., 2019)
Iceberg lettuce	<i>Lactococcus lactis</i> IPLA 1064, <i>Lactobacillus paraplanarum</i> IPLA C23	(Allende et al., 2007)

1.5.1 Προβιοτική Δράση

Όπως ορίζεται από τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO) και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), ζωντανοί μικροοργανισμοί που παρέχουν οφέλη για την υγεία όταν καταναλώνονται σε επαρκείς ποσότητες χαρακτηρίζονται ως προβιοτικά. Για να θεωρηθεί ένας μικροοργανισμός προβιοτικός, πρέπει να πληροί διάφορα κριτήρια. Θα πρέπει να έχει αναγνωριστεί ως γενικά αναγνωρισμένο ως ασφαλές (GRAS), να επιδεικνύει ανοχή στη χολή και τα οξέα για να επιβιώνει από τη γαστρεντερική διέλευση, να προσκολλάται στις επιφάνειες του εντέρου και να παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση έναντι παθογόνων μικροοργανισμών. Τα προβιοτικά διαφέρουν από τα παθογόνα βακτήρια καθώς δεν διεγείρουν υπερβολικές ανοσολογικές αντιδράσεις, ούτε προκαλούν φλεγμονή. Αντίθετα, συμβάλλουν στην ισορροπία της χλωρίδας του εντέρου και έχουν οφέλη για την υγεία.

Τα πιο γνωστά προβιοτικά στελέχη περιλαμβάνουν εκείνα του γένους *Lactobacillus*, όπως *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* και *L. casei*, και του γένους *Bifidobacterium* κτλ. Άλλα προβιοτικά βακτήρια περιλαμβάνουν τα *Pediococcus acidilactici*, *Lactococcus lactis subsp. lactis* και *Streptococcus thermophilus*, καθώς και ορισμένες ζύμες, όπως ο *Saccharomyces boulardii*, παίζουν επίσης ρόλο ως προβιοτικά.

Μια κρίσιμη λειτουργία των προβιοτικών είναι οι αντιμικροβιακές ή ανταγωνιστικές επιδράσεις τους στα παθογόνα βακτήρια, η οποία είναι ζωτικής σημασίας για τη διατήρηση της ισορροπίας της εντερικής χλωρίδας. Οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν τον ανταγωνιστικό αποκλεισμό, τη διαμόρφωση του ανοσοποιητικού συστήματος και την παραγωγή ουσιών όπως τα οργανικά οξέα και οι βακτηριοκίνες, οι οποίες αναστέλλουν τα επιβλαβή βακτήρια. Οι ουσίες αυτές περιλαμβάνουν γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ, υπεροξειδίο του υδρογόνου και διάφορες βακτηριοκίνες, όπως η νισίνη και η λακτοκίνη.

Αν και παραδοσιακά θεωρούνταν ότι τα προβιοτικά πρέπει να είναι ανθρώπινης προέλευσης για να είναι αποτελεσματικά, έχει αποδειχθεί ότι και μη ανθρώπινα στελέχη μπορούν επίσης να προσφέρουν οφέλη για την υγεία (Fijan, 2016; Denkova et al., 2017).

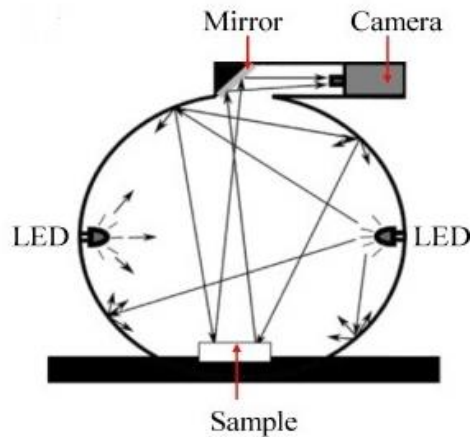
1.6 Μέθοδοι ανάλυσης για τον προσδιορισμό της αλλοίωσης

Τα φυλλώδη λαχανικά εμφανίζουν μια φυσιολογική υποβάθμιση της ποιότητας και της ασφάλειας τους λόγω τις ελάχιστης επεξεργασίας τους, καθώς και εξαιτίας άλλων παραγόντων που αναλύθηκαν παραπάνω. Έτσι, δημιουργείται επιτακτική ανάγκη εφαρμογής εναλλακτικών και γρήγορων τεχνικών για την πρόβλεψη της ποιότητας και της ασφάλειας των προϊόντων. Η αναλυτική τεχνολογία διεργασιών (Process Analytical Technology, PAT), είναι μια προσέγγιση για την αξιολόγηση των τροφίμων και όχι μόνο, η οποία συνδυάζει πολυμεταβλητά δεδομένα σε πραγματικό χρόνο. Αναλυτικές τεχνικές PAT θεωρούνται οι φασματοσκοπικές μέθοδοι όπως η φασματοσκοπία δονήσεων (FT-IR, NIR, Raman) η υπερφασματική και πολυφασματική απεικόνιση και οι βιομιμητικοί αισθητήρες (e-nose, e-tongue) (Spyrelli et al., 2020). Συγκριτικά με τις συμβατικές μικροβιολογικές μεθόδους, οι φασματοσκοπικές τεχνικές και οι τεχνικές απεικόνισης υπερτερούν λόγω της ελάχιστης προετοιμασίας του δείγματος, της μη καταστροφικής δειγματοληψίας και της απόκτησης γρήγορων αποτελεσμάτων (Nychas et al., 2016; Wang et al., 2018).

1.6.1 Πολυφασματική απεικόνιση (Multispectral Imaging, MSI)

Η πολυφασματική απεικόνιση (Multispectral Imaging, MSI) είναι μια τεχνική, η οποία συνδυάζει τη φασματοσκοπία δονήσεων (Vibrational Spectroscopy), τη φασματοσκοπία ορατού και την υπολογιστική όραση (Computer Vision) (Ropodi et al., 2016).

Τα κύρια μέρη ενός συστήματος πολυφασματικής απεικόνισης περιλαμβάνουν μια φωτεινή πηγή, έναν αισθητήρα φωτός, ένα φασματογράφο, μια φωτογραφική μηχανική (υψηλής ευκρίνειας), ένα μετατροπέα σήματος και έναν υπολογιστή με το αντίστοιχο λογισμικό για την επεξεργασία εικόνας (Tsakanikas et al., 2016; Feng et al., 2018). Συνοπτικά, μέσω της πηγής εκπέμπεται φως, διαχωρίζεται σε φασματικές ζώνες και ακτινοβολεί στο εξεταζόμενο δείγμα. Ένα μέρος του φωτός που προσπίπτει στο δείγμα μεταδίδεται και ένα μέρος ανακλάται. Μέσω τεχνολογίας υπολογιστικής όρασης καταγράφεται η εικόνα, η οποία μπορεί να επεξεργαστεί περεταίρω μέσω τους λογισμικού στον υπολογιστή (Pamproukis et al., 2022).



Εικόνα 1.9 Σχηματική αναπαράσταση οργάνου πολυφασματικής απεικόνισης (Feng et al., 2018)

Το παραπάνω σύστημα συλλέγει πολυφασματικές ζώνες (Bands), οι οποίες υπάρχουν ως πολλές εικόνες και αποτελούν ένα συνδυασμό τρισδιάστατου φασματικού κύβου δεδομένων (x,y,λ). Τα x,y αντιπροσωπεύουν τις δυο χωρικές διαστάσεις του εξεταζόμενου δείγματος, ενώ το λ αντιστοιχεί στη φασματική διάσταση, ορατού και υπέρυθρου (VIS/IR). Αναφορικά με την ανάλυση ποιότητας και ασφάλειας τροφίμων, συχνά χρησιμοποιούνται συστήματα πολυφασματικής απεικόνισης με λήψη φασματικών δεδομένων στην περιοχή από 380 έως 2500nm. Τα φάσματα που προκύπτουν μπορούν να αποδώσουν πληθώρα πληροφοριών οι οποίες σχετίζονται με τις απορροφήσεις χρωστικών ουσιών και αποχρώσεων ή οι συνδυασμοί μοριακών δεσμών, όπως C-H, N-H, O-H.

Το σύστημα πολυφασματικής απεικόνισης θεωρείται διάδοχος της υπερφασματικής απεικόνισης (Hyperspectral Image, HSI) και μπορεί να υπερπηδήσει τις δυσκολίες που παρουσιάζονται. Στις υπερφασματικές εικόνες, κάθε pixel δημιουργεί ένα συνεχές φάσμα με αποτέλεσμα να σχηματίζεται τεράστιος όγκος δεδομένων, αυξάνοντας το κόστος και τον υπολογιστικό φόρτο. Αντίθετα, η πολυφασματική απεικόνιση είναι μια τεχνική, η οποία καταγράφει πληροφορίες για ένα μικρότερο σύνολο φασματικών ζωνών, επιτυγχάνοντας ταχύτερη αναγνώριση και ανίχνευση (Qin et al., 2013; Su & Sun, 2018).

Γενικότερα, οι τεχνικές φασματικής απεικόνισης πλεονεκτούν στο γεγονός ότι είναι φιλικές προς το περιβάλλον, μη επεμβατικές τεχνικές και εξοικονομούν χρόνο. Ταυτόχρονα, η αποτελεσματικότητα σε πραγματικό χρόνο διευκολύνει τη εδραίωση της πολυφασματικής απεικόνισης στη βιομηχανία τροφίμων (Feng et al., 2018). Έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί μελετώντας διάφορα τρόφιμα μέσω της τεχνικής της πολυφασματικής απεικόνισης, όπως για παράδειγμα προϊόντα πουλερικών (Spyrelli et al., 2020), χοιρινό κρέας (Dissing et al.,

2013), ψάρι (Govari et al., 2021), ντομάτα (Shrestha et al., 2015), ανανά (Manthou et al., 2020), φυλλώδη λαχανικά (Manthou et al., 2022) κ.α.

1.6.2 Φασματοσκόπια υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR)

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) είναι μια αναλυτική, δονητική τεχνική, μέσω της οποίας λαμβάνονται απαραίτητες πληροφορίες σχετικές με τις περιστροφικές και δονητικές μεταβάσεις των μορίων βάσει το υπέρυθρο φάσμα απορρόφησης και εκπομπής τους (Pamproukis et al., 2022).

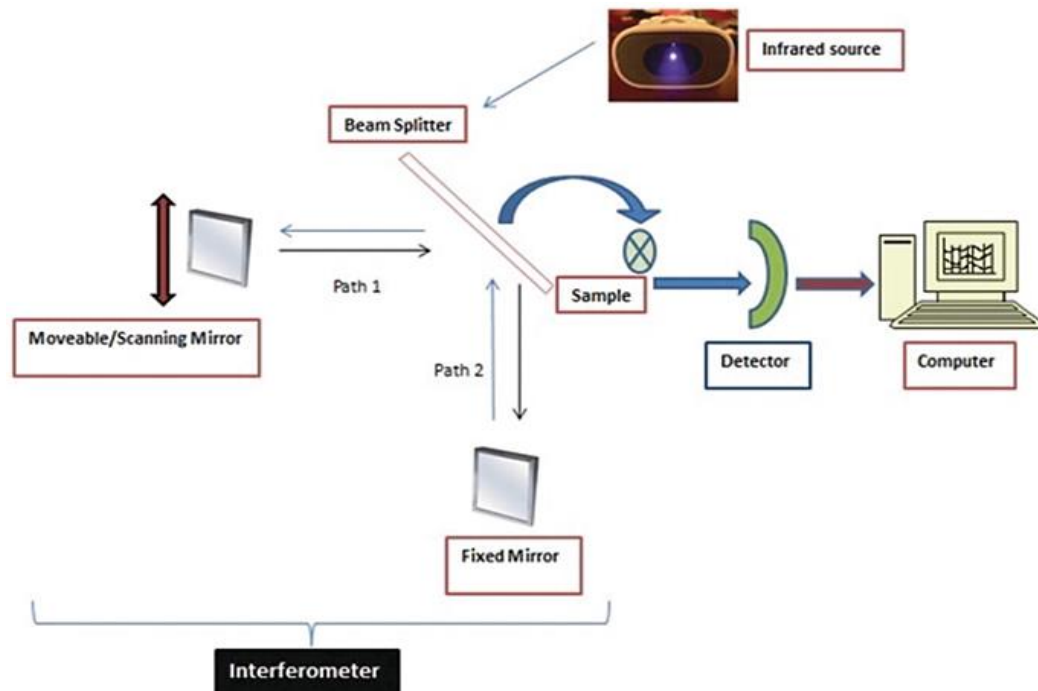
Όταν μια πηγή υπέρυθρου φωτός, συνεχούς μήκους κύματος, πέφτει στο μετρούμενο δείγμα, τότε το υπέρυθρο φως απορροφάται σε μια συγκεκριμένη συχνότητα από ένα μόριο που αντιστοιχεί στο χαρακτηριστικό δεσμό στο μόριο του δείγματος. Ο χαρακτηριστικός δεσμός αυτός απορροφά επιλεκτικά φως από την υπέρυθρη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, προκαλώντας μοριακή δόνηση. Η συγκεκριμένη απορρόφηση αντιστοιχεί στους χαρακτηριστικούς χημικούς δεσμούς στο μόριο του δείγματος. Το φάσμα υπέρυθρων ταξινομείται σε τρεις περιοχές, την περιοχή του εγγύς υπέρυθρου (NIR) ($14.000-4000\text{ cm}^{-1}$), τη θεμελιώδη περιοχή (IR) ($4000-400\text{ cm}^{-1}$) και την περιοχή άπω υπέρυθρου (FIR) ($400-10\text{ cm}^{-1}$) (Dutta, 2017; Qi et al., 2022).

Η βασική δομή του οργάνου FTIR αποτελείται από τα εξής:

- i. Πηγή ακτινοβολίας: Η ενέργεια των υπέρυθρων εκπέμπεται από μια πηγή μαύρου σώματος. Η δέσμη διέρχεται από μια σχισμή η οποία ελέγχει την προσπίπτουσα ενέργεια στο δείγμα.
- ii. Συμβολόμετρο Michelson (ή ιντερφερόμετρο): Αποτελείται από μια συστοιχία κατόπτρων, από τα οποία ένα κινείται και ένα διαχωριστή δέσμης. Ο διαχωριστής δέσμης είναι μια ημιανακλαστική συσκευή με μια λεπτή μεμβράνη γερμανίου σε επίπεδο υπόστρωμα βρωμιούχου καλίου (KBr). Ο διαχωριστής λαμβάνει την υπέρυθρη δέσμη και τη διαχωρίζει σε δύο. Η μια δέσμη αντανακλάται στο διαρκώς κινούμενο καθρέφτη, ενώ η άλλη προσπίπτει στο σταθερό καθρέφτη. Οι δύο δέσμες ανασυνδιάζονται και τελικά συναντώνται ξανά στο διαχωριστή. Ο κινούμενος καθρέφτης κινείται με σταθερή ταχύτητα, με αποτέλεσμα οι δύο δέσμες να σχηματίζουν διαφορά εύρους φωτός και να προκαλούν παρεμβολή. Έτσι,

λαμβάνονται δεδομένα μέσω του αποτελέσματος των δυο αυτών παλμών σε αλληλεπίδραση μεταξύ τους.

- iii. Δείγμα: Η συνολική δέσμη ακτινοβολίας, με τη βοήθεια του κατόπτρου, εισέρχεται στο ως προς εξέταση δείγμα, το οποίο είτε την αντανακλά είτε τη μεταδίδει, κατευθύνοντάς την προς τον ανιχνευτή. Δημιουργείται έτσι το μοναδικό μοριακό αποτύπωμα κάθε δείγματος.
- iv. Ανιχνευτής: Η δέσμη διέρχεται από τον ανιχνευτή, οποίος είναι σχεδιασμένος να μετρά το ειδικό σήμα παρεμβολής.
- v. Υπολογιστής: Το μετρούμενο σήμα εξέρχεται σε ψηφιακή μορφή και υπόκεινται σε μετασχηματισμός κατά Fourier. Τελικά, το φάσμα υπέρυθρης ακτινοβολίας έναντι της συχνότητας παρουσιάζεται στο χρήστη (Dutta, 2017;Pamproukis et al., 2022;Qi et al., 2022).



Εικόνα 1.10 Σχηματικό διάγραμμα ενός οργάνου υπέρυθρου μετασχηματισμού κατά Fourier (Ahmad & Ayub, 2022)

Ως πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής, αναφέρεται ότι είναι μια γρήγορη, μη καταστροφική τεχνική, η οποία είναι ακριβής. Επίσης, είναι φιλική προς το χρήστη καθώς δεν απαιτεί εξωτερική βαθμονόμηση και είναι μηχανικά απλή (Dutta, 2017;Ahmad & Ayub, 2022).

Πολλοί ερευνητές έχουν εφαρμόσει τη φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier με πληθώρα προκλήσεων σε ποικιλία τροφίμων και ποτών (Ahmad & Ayub, 2022). Αναφέροντας ορισμένα παραδείγματα, έχει εφαρμοστεί σε ψάρι (Fengou et al., 2019), σε φιλέτο στήθος κοτόπουλο (Spyrelli et al., 2021), σε κιμά χοιρινού κρέατος (Papadopoulou et al., 2011), σε τυρί φέτα (Papadopoulou et al., 2018) σε κρέμα βανίλιας (Lianou et al., 2018), σε χυμό φρούτων (Sourri et al., 2022), σε ελαιόλαδο (Revelou et al., 2021), σε κρασί (Basalekou et al., 2019), σε μέλι (Xagoraris et al., 2021), σε φυλλώδη λαχανικά (Manthou et al., 2022) (Tsakanikas et al., 2018) κτλ.

Σκοπός

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή στοχεύει στη μελέτη της επίδρασης των ελεύθερων κυττάρων του *Lactobacillus pentosus* FMCC B281 και του υπερκείμενου αυτού έναντι δυο παθογόνων μικροοργανισμών *L. monocytogenes* και *E. Coli*, σε φρεσκοκομμένες σαλάτες (έτοιμες προς κατανάλωση) κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Στόχος, επίσης, είναι η συσχέτιση των μικροβιολογικών αποτελεσμάτων, με τα δεδομένα που προέκυψαν με τη μέθοδο της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI) και τη φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FTIR) για κάθε περίπτωση, προσδοκώντας την έγκαιρη ανίχνευση της μικροβιολογικής ποιότητας, υπό αναερόβιες και τροποποιημένες συνθήκες.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Τα συσκευασμένα δείγματα μαρουλιού (Romaine) συντηρήθηκαν σε συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας (Modified Atmosphere Packaging, MAP). Όλα τα δείγματα εμβολιάστηκαν με παθογόνο μικροοργανισμό και χωρίστηκαν σε τρεις περιπτώσεις ανάλογα με το είδος ψεκασμού που πραγματοποιήθηκε: i) ζωμός λαχανικών (control), ii) υπερκείμενο του μικροοργανισμού και iii) ελευθέρα κύτταρα. Έλαβαν χώρα δύο ανεξάρτητες επαναλήψεις για κάθε περίπτωση παθογόνου με σκοπό τη συλλογή φασματοσκοπικών και μικροβιολογικών δεδομένων. Η συντήρηση του μαρουλιού πραγματοποιήθηκε σε θαλάμους συντήρησης σε δυο διαφορετικές θερμοκρασίες, στους 4°C και 10°C.



Εικόνα 2.1 Θάλαμοι συντήρησης (MIR153, Sanyo Electric Co., Osaka, Japan)

Το πείραμα χωρίστηκε σε δύο μέρη, επαναλαμβάνοντας την ίδια διαδικασία, με τη μόνη διαφορά του εμβολιασμού με διαφορετικό παθογόνο μικροοργανισμό. Στην πρώτη περίπτωση τα φύλλα μαρουλιού εμβολιάστηκαν με *L. monocytogenes* και στη δεύτερη περίπτωση με *E. coli*. Κάθε πειραματικό μέρος διήρκησε περίπου δύο εβδομάδες, με οκτώ σημεία δειγματοληψίας το κάθε ένα και για τις δυο θερμοκρασίες.

Οι δειγματοληψίες για κάθε θερμοκρασία πραγματοποιήθηκαν έτσι ώστε να υπάρχουν επαρκή δεδομένα για τις δύο θερμοκρασίες ανάλογα με το χρόνο αλλοίωσης των δειγμάτων και ολοκληρώθηκαν εφόσον τα δείγματα ήταν απορριπτέα μέσω οργανοληπτικής αξιολόγησης.

2.2 Προετοιμασία δειγμάτων

2.2.1 Προ-πείραμα

Με σκοπό την υλοποίηση του πειραματικού σχεδιασμού, προηγήθηκαν πειράματα έτσι ώστε να επιλεγθούν τα πιο κατάλληλα στελέχη, αντιμικροβιακής δράσης έναντι παθογόνων μικροοργανισμών. Συνολικά, το προ-πείραμα συμπεριλάμβανε οκτώ βακτήρια τεχνολογικής σημασίας: *L. pentosus* B281, *L. plantarum* B282 οι οποίοι έχουν απομονωθεί από ζυμωμένες ελιές (Doulgeraki et al., 2013), *L. plantarum* T571 από άλμη φέτας, *L. plantarum* L125 και *L. pentosus* L33 από ζυμωμένο κρέας (Pavli et al., 2016), *Leuconostoc mesenteroides* FMX3 από λευκό τυρί σε άλμη και *Lactococcus Lactis* SMX2 από ημίσκληρο τυρί (Kamarinou et al., 2022). Ως παθογόνοι μικροοργανισμοί επιλέχθηκαν τα στελέχη *L. monocytogenes*, B127 και B133, καθώς και τα στελέχη *E. coli*, B290 και B289. Όλα τα στελέχη μικροοργανισμών που μελετήθηκαν ανακτήθηκαν από τη συλλογή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων (FMCC).

Αρχικά, τα οκτώ στελέχη βακτηρίων αναπτύχθηκαν σε MRS Broth (De Man, Rogosa and Sharpe Broth) στους 30°C, ενώ οι παθογόνοι μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν σε TSB (Tryptic Soy Broth) στους 37°C για 24 ώρες και στις δύο περιπτώσεις. Στην συνέχεια, σε τρυβλία επιστρωμένα με TSA (Tryptic Soy Agar), εξαπλώθηκαν με τη μέθοδο της επιφανειακής επίστρωσης 100 ml από τα στελέχη των παθογόνων.

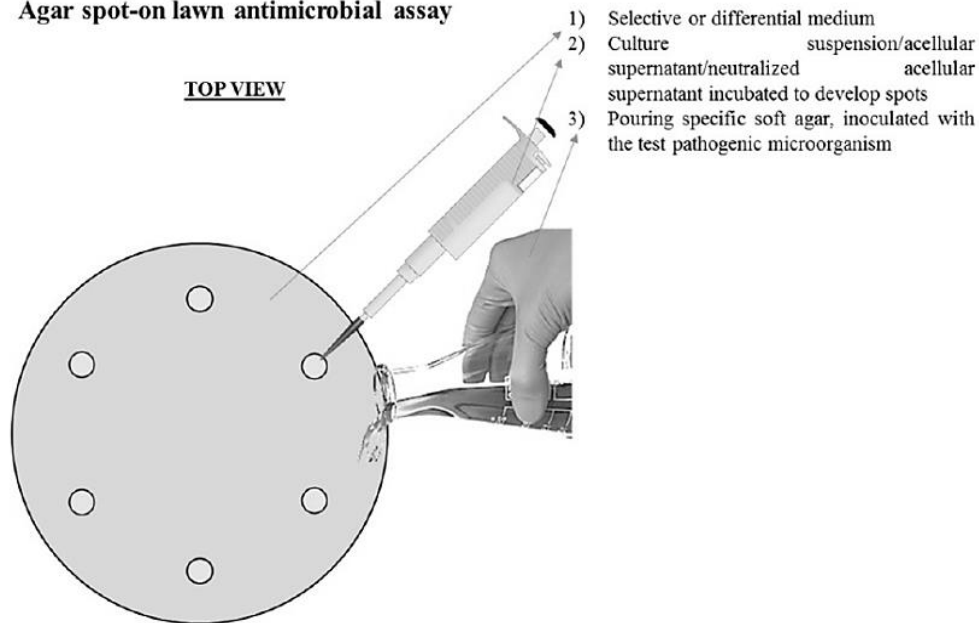
Δεδομένου ότι το MRS δεν θεωρείται ένα a “food grade” θρεπτικό μέσο, διερευνάται η χρήση εναλλακτικών θρεπτικών μέσω όπως χυμοί φρούτων και λαχανικών (Ramos et al., 2020). Για τον λόγο αυτό, από τα βακτήρια, 300 ml μεταφέρθηκαν σε 5ml ζωμού λαχανικών. Τα παραπάνω επωάστηκαν στους 30 °C για 24 ώρες.

Η διαδικασία προετοιμασίας και παρασκευής του ζωμού πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Manios et al. (2013). Αρχικά, αφαιρέθηκαν τα εξωτερικά φύλλα μαρουλιού και λάχανου και τα υπόλοιπα πλύθηκαν με νερό βρύσης. Στη συνέχεια, εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα νερού - υποχλωριώδους νατρίου και παρέμειναν για 5 λεπτά. Έπειτα, πλύθηκαν προσεκτικά με τρεχούμενο νερό και απλώθηκαν σε laminae προκειμένου να στεγνώσουν για 30 λεπτά. Τα φύλλα του μαρουλιού και του λάχανου κόπηκαν με αποστειρωμένο ψαλίδι και αναμείχθηκαν σε αναλογία 1:1 με ζεστό απεσταγμένο νερό (45°C), για 1 λεπτό σε υψηλή ταχύτητα. Αφού αναδεύτηκε ο πολτός, θερμάνθηκε στους 80°C για 2 ώρες. Ακολούθησε η διήθηση του πολτού μέσω χαρτιού Whatman και η αποστείρωση του διηθημένου ζωμού σε αυτόκαυστο για 15 λεπτά στους 121°C.

Μετά την επώαση, ακολούθησε η διαδικασία της φυγοκέντρισης. Σκοπός της φυγοκέντρισης είναι να διαχωρίσει το υπερκείμενο υγρό (supernatant) από το μικροοργανισμό (βιομάζα). Για τη διαδικασία της φυγοκέντρισης, οι μικροοργανισμοί μέσα στο ζυμό μεταφέρθηκαν σε δοχεία falcon υπό ασηπτικές συνθήκες. Είναι σημαντικό για σε κάθε φυγοκέντρωση η ζύγιση των όγκων, έτσι ώστε ίσοι όγκοι να τοποθετηθούν αντιδιαμετρικά εντός της φυγοκέντρου και να εκτελεστεί σωστά η διαδικασία. Η φυγοκέντρωση πραγματοποιούνταν κάθε φορά στις 5.000 στροφές, στους 4°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια για την απομόνωση του υπερκείμενου, αποχύθηκε σε νέο falcon το υπερκείμενο που προέκυψε από τη διαδικασία της φυγοκέντρισης και πραγματοποιήθηκε εκ νέου φυγοκέντρωση, για να εξασφαλιστεί η καθαρότητα του υπερκείμενου. Για την απομόνωση του μικροοργανισμού, στο falcon που κατακάθισε η βιομάζα του μικροοργανισμού και αφού αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, προστέθηκε αποστειρωμένο αλατούχο διάλυμα Ringer και αναδεύτηκε με τη χρήση vortex. Επαναλήφθηκε η διαδικασία της φυγοκέντρισης, της απόχυσης του υπερκείμενου, της πλήρωσης του δοχείου με διάλυμα Ringer και τελικά προέκυψε καθαρός ο μικροοργανισμός.

Μετά το πέρας της φυγοκέντρισης και αφού προέκυψαν τα αντίστοιχα υπερκείμενα υγρά και οι καθαροί μικροοργανισμοί κάθε βακτηρίου, πραγματοποιήθηκε τεχνική για την πρόβλεψη της αντιμικροβιακής δράσης έναντι των παθογόνων που είχαν επιστρωθεί σε τρυβλία TSA. Η δοκιμή της αντιμικροβιακής δράσης έγινε με την τεχνική spot-on lawn (Εικόνα 2.2). Η τεχνική spot-on lawn έχει περιγράψει από διάφορους συγγραφείς (Fijan, 2016; Denkova et al., 2017). Έτσι, πάνω στα τρυβλία γενικού υποστρώματος επιστρωμένα με παθογόνους μικροοργανισμούς, δημιουργήθηκαν κηλίδες (spot), με τη χρήση μηχανικής πιπέτας. Σκοπός ήταν να αναδειχθεί η ανταγωνιστική δράση βακτηρίων και παθογόνων και το μέγεθος της περιοριστής δράσης των παθογόνων.

Agar spot-on lawn antimicrobial assay



Εικόνα 2.2 Σχηματική απεικόνιση δοκιμής αντιμικροβιακής δράσης με τεχνική *spot-on lawn* (Denkova et al., 2017)

Αφού επώαστηκαν στους 37°C, αναδείχθηκε και ξεχώρισε η ανταγωνιστική δράση ορισμένων βακτηρίων έναντι των παθογόνων. Συγκεκριμένα, περιοριστική δράση στην ανάπτυξη των *L. monocytogenes* FMCC B127, *L. monocytogenes* FMCC B133, *E. coli* FMCC B289, *E. coli* FMCC B290 φάνηκε να έχουν τα εξής βακτήρια: *L. pentosus* FMCC B281, *L. plantarum* FMCC L125, *Lactococcus Lactis* FMCC SMX2. Πιο συγκεκριμένα, ο *Lactococcus Lactis* SMX2 είχε εμφανή επίδραση στα στελέχη *L. monocytogenes* B133 και *E. coli* B289, ενώ ισχυρή δράση έδειξε ο *L. plantarum* L125 έναντι των *L. monocytogenes* B127, *L. monocytogenes* B133 και *E. coli* B290. Τέλος, ο *L. pentosus* B281 αναδείχθηκε μέσω της παραπάνω δοκιμής, καθώς επέδειξε την ισχυρότερη δράση έναντι της ανάπτυξης όλων των στελεχών και των δύο παθογόνων. Συμπερασματικά, επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί ο *L. pentosus* B281 και στα δύο μέρη του πειράματος για κάθε παθογόνο μικροοργανισμό.

Για κάθε μέρος του πειράματος, χρησιμοποιήθηκαν και τα δυο στελέχη κάθε παθογόνου, δηλαδή δυο στελέχη για *E.coli* (FMCC B289, FMCC B290) και δύο για *L. monocytogenes* (FMCC B127, FMCC B133), τα οποία αναμείχθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν και αντιμετωπίστηκαν ως ένα παθογόνο για κάθε μέρος του πειράματος.

2.2.2 Εμβολιασμός και συσκευασία δειγμάτων

Μαρούλια (Romaine) που αγοράστηκαν, από τοπική αγορά, σε διαφορετικές παρτίδες για κάθε μέρος του πειράματος, χρησιμοποιήθηκαν για την υλοποίηση του. Αρχικά, από τα μαρούλια αφαιρέθηκαν τα εξωτερικά φύλλα και πλύθηκαν προσεκτικά υπό τρεχούμενο νερό. Στη συνέχεια, στέγνωσαν και κόπηκαν σε λωρίδες με αποστειρωμένο ψαλίδι σε πάχος τέτοιο ώστε να προσομοιάζουν τις έτοιμες σαλάτες του εμπορίου. Έπειτα ζυγίστηκαν σε παρτίδες των 300gr και μεταφέρθηκαν μέσα σε laminar flow cabinet.

Για τον εμβολιασμό, οι παθογόνοι μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν σε TSB (Tryptic Soy Broth) στους 37°C για 18 ώρες. Για την χρήση του *L. pentosus* B281, προηγήθηκε η ανάπτυξή του σε ζωμό λαχανικών, οποίος είχε παρασκευαστεί όπως περιγράφεται στο πείραμα και επώαση στους 30°C για 24 ώρες. Ακολούθησε η διαδικασία της φυγοκέντρισης, όπως περιγράφεται παραπάνω, για τον διαχωρισμό του υπερκειμένου υγρού του και των ελεύθερων κυττάρων (βιομάζα).

Ξεκινώντας με τον εμβολιασμό του παθογόνου και έχοντας ως αρχικό πληθυσμό 10^{-3} αραίωση, τα φύλλα του μαρουλιού εμβολιάστηκαν 3 φορές με 1ml παθογόνου στα 300gr. Επομένως, αντιστοιχεί 1ml από την αραίωση του παθογόνου ανά 100 gr μαρουλιού. Για την ομοιόμορφη εξάπλωση του εμβολίου, τα φύλλα ανακατευτήκαν προσεκτικά. Ακολούθησε η μέθοδος του ψεκασμού για τις τρεις περιπτώσεις: i) broth (σκέτος ζωμός λαχανικών), ii) υπερκείμενο του *L. pentosus* FMCC B281 και iii) ελεύθερα κύτταρα (καθαρός μικροοργανισμός). Για κάθε μία από τις παραπάνω περιπτώσεις ψεκάστηκαν 3ml ανά 300gr μαρουλιού.

Τα μαρούλια χωρίστηκαν σε δείγματα των 30 gr και τοποθετήθηκαν σε σακούλες (Flexopack S.A., Athens), οι οποίες τοποθετήθηκαν σε μηχανήμα συσκευασίας Henkovaac 1900 (Howden Food 50 Equipment B.V., The Netherlands), όπου συσκευάζονταν υπό συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας, με περιεκτικότητα 10% CO₂ / 10% O₂ / 80% N₂. Μέσα στο μηχανήμα αφού αφαιρείται ο αέρας και δημιουργείται κενό στις σακούλες, ακολουθεί η πλήρωση της σακούλας με το μίγμα αερίων και στο τέλος γίνεται συγκόλληση ώστε να μην υπάρχουν διαρροές. Τέλος, οι σακούλες αποθηκευτήκαν σε δυο διαφορετικές θερμοκρασίες, 4°C και 10°C.

Η παραπάνω διαδικασία ακολουθήθηκε με τον ίδιο τρόπο για τους δύο παθογόνους μικροοργανισμούς, μια φορά για *L. monocytogenes* έχοντας αναμείξει ως ένα τα στελέχη

FMCC B127 και FMCC B133 και μία φορά για *E. coli* με ανάμειξη των στελεχών FMCC B289 και FMCC B290.



Εικόνα 2.3 Αποθήκευση δειγμάτων σε κλιβάνους

2.3 Μικροβιολογικές αναλύσεις

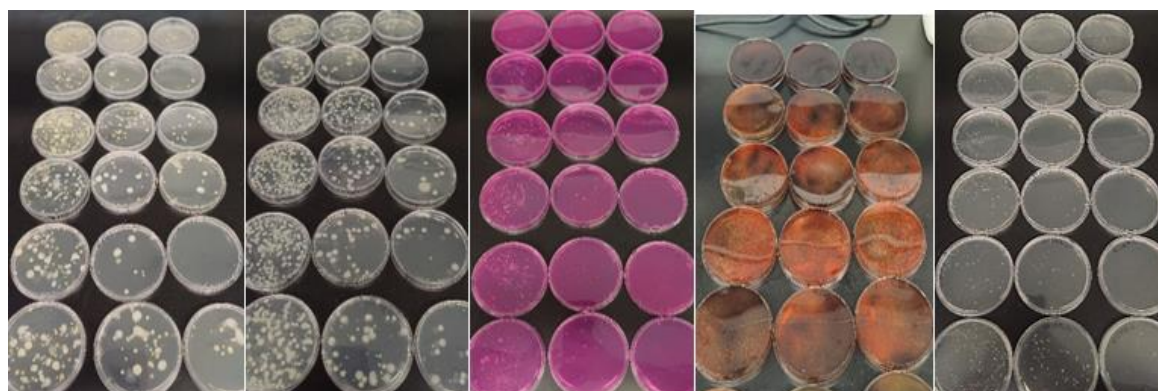
Κατά τη διαδικασία της δειγματοληψίας, με τη βοήθεια λαβίδας, ζυγίστηκαν 10gr δείγματος (2 ανεξάρτητα δείγματα για κάθε περίπτωση, Α και Β) σε αποστειρωμένη σακούλα ομογενοποίησης (BagLight®, INTERSCIENCE, France). Έπειτα, προστέθηκαν 90ml αποστειρωμένου, αλατούχου διαλύματος Ringer (LAB M Limited, Lancashire, U.K.) και ομογενοποιήθηκαν σε συσκευή Stomacher (Lab Blender 400, Seward Medical, London) για 60 sec, με σκοπό τη δεκαδική αραιώση του δείγματος. Ακολούθησαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις του δείγματος, προσθέτοντας 1ml της προηγούμενης αραιώσης σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 9 mL αποστειρωμένου διαλύματος Ringer. Όλη η διαδικασία της δειγματοληψίας εκτελέστηκε υπό ασηπτικές συνθήκες.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός τρυβλίων με την κατάλληλη αραιώση κάθε φορά σε αντίστοιχο θρεπτικό υπόστρωμα, υπό ασηπτικές συνθήκες. Ο εμβολιασμός στα υποστρώματα επιφανειακής επίστρωσης πραγματοποιούνταν με 0.1ml δείγματος από την κατάλληλη αραιώση και γινόταν εξάπλωση του εμβολίου με τη χρήση αποστειρωμένου τριγώνου. Για την τεχνική ενσωμάτωσης, 1ml εμβολίου της αντίστοιχης αραιώσης τοποθετούνταν σε κενό τρυβλίο και προστίθονταν υπόστρωμα υγρής μορφής έως ότου πληρωθεί το τρυβλίο. Μετά τη στερεοποίηση της πρώτης στρώσης, μια δεύτερη στρώση

του υλικού απλωνόταν. Τα εμβολιασμένα τρυβλία μεταφέρονταν σε θαλάμους επώασης στην κατάλληλη θερμοκρασία και για το χρονικό διάστημα που ορίζεται από τον κατασκευαστή του κάθε υλικού. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, καταμετρούνταν οι εμφανιζόμενες αποικίες για κάθε υπόστρωμα. Χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω θρεπτικά υποστρώματα:

Τεχνική επιφανειακής επίστρωσης:

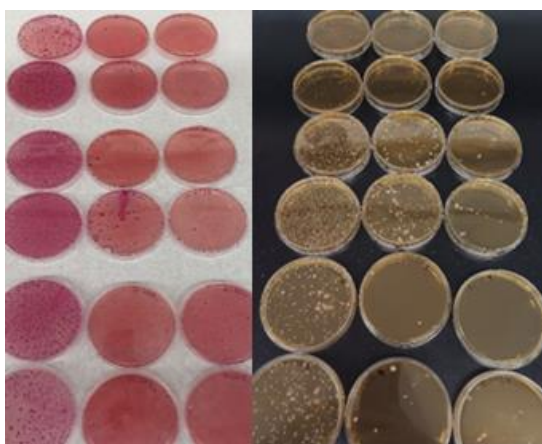
- i. **Plate Count Agar (PCA)** (Tryptic Glucose Yeast Agar PCA, Ref. 4021452, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy): για την Ολική Μικροβιακή Χλωρίδα, με επώαση στους 30°C για 48 ώρες.
- ii. **Pseudomonas Agar Base** (LAB108, LAB M., U.K.): με την προσθήκη του επιλεκτικού αντιβιοτικού Ceftrimide-Fusidin-Cephaloridine (CFC) (Modified C.F.C X108, LAB M, UK), για την απαρίθμηση των αποικιών *Pseudomonas* spp, με επώαση στους 25°C για 48 ώρες.
- iii. **Rose Bengal Chloramphenicol Agar (RBC)** (Lab M Limited) με προσθήκη αντιβιοτικού Chloramphenicol (LAB M, UK): για την απαρίθμηση των ζυμών και μυκήτων, με επώαση στους 25°C για 72 ώρες.
- iv. **Listeria Palcam Agar Base** (Ref. 4016042, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy) με προσθήκη αντιβιοτικού Palcam (Listeria Palcam Antimicrobial Supplement, Ref. 4240042, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy): για την απαρίθμηση των αποικιών *L. monocytogenes*, με επώαση στους 37 °C για 24 ώρες
- v. **Harlequin® Tryptone Bile Glucuronide Agar (TBX)** (NCM1001, NEOGEN, USA, Canada): για την απαρίθμηση των αποικιών *E.coli*, με επώαση στους 44°C για 24 ώρες.



Εικόνα 2.4 Αποικίες μικροοργανισμών σε υλικά επιφανειακής επίστρωσης (Σειρά εμφάνισης εικόνων από αριστερά προς τα δεξιά αντίστοιχη με τη σειρά απαρίθμησης των υλικών)

Τεχνική ενσωμάτωσης:

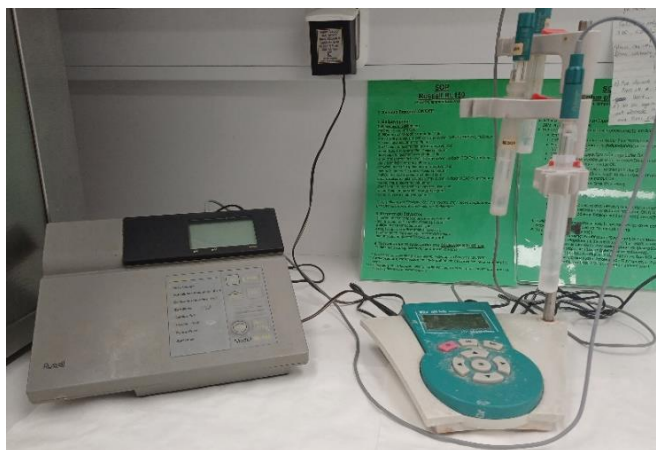
- vi. **Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA)** (Ref. 4021862, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy): για την απαρίθμηση των αποικιών Enterobacteriaceae, με επώαση στους 37°C για 24 ώρες.
- vii. **De Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS)** (Ref.401728S2, Biolife, Italiana S.r.l, Milano, Italy): για την απαρίθμηση των γαλακτικών βακτηρίων με την τεχνική της ενσωμάτωσης, με επώαση στους 30°C για 72 ώρες.



Εικόνα 2.5 Αποικίες μικροοργανισμών σε υλικά ενσωμάτωσης (Σειρά εμφάνισης εικόνων από αριστερά προς τα δεξιά αντίστοιχη με τη σειρά απαρίθμησης των υλικών)

2.4 Μέτρηση pH

Μετά το πέρας των μικροβιολογικών αναλύσεων πραγματοποιούνταν μέτρηση του pH, στην πρώτη δεκαδική αραίωση του κάθε δείγματος, με τη χρήση ψηφιακού οργάνου μέτρησης Russell RL150 (Russell Inc, Cork, Ireland), με γυάλινο ηλεκτρόδιο (Metrohm AG, Herisau, Switzerland). Πριν από τη μέτρηση του pH, το όργανο βαθμονομούνταν με πρότυπα διαλύματα pH 4,7 και 10. Η ακρίβεια του οργάνου ανέρχεται στο ± 0.2 .



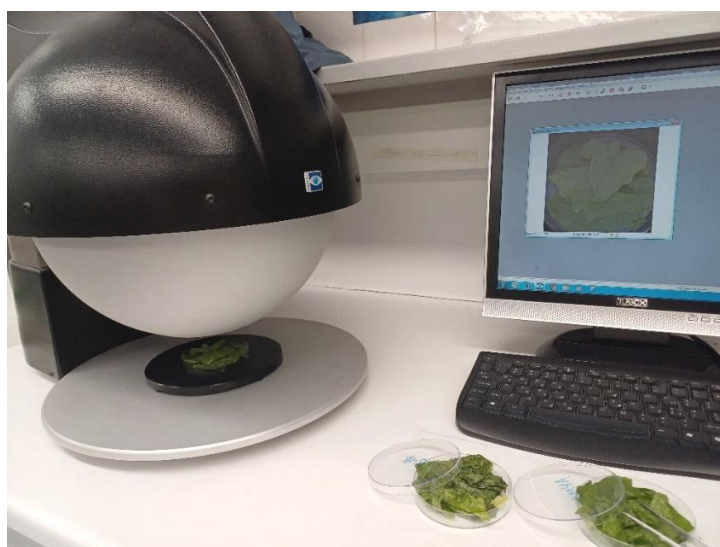
Εικόνα 2.6. Όργανο μέτρησης pH

2.5 Οργανοληπτικός έλεγχος

Ο οργανοληπτικός έλεγχος πραγματοποιούταν σύμφωνα με τη συνολική εμφάνιση του δείγματος (χρώμα, μάρανση κτλ.) και την οσμή. Η αξιολόγηση πραγματοποιούταν από μη εκπαιδευμένα άτομα, έχοντας ως γνώμονα και τις προτιμήσεις του μέσου καταναλωτή. Όταν το δείγμα θεωρούταν μη αποδεκτό έστω και κατά μια μόνο παράμετρο, το πείραμα ολοκληρωνόταν σε σύντομο χρονικό διάστημα από την αξιολόγηση αυτή. Κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας, αξιολογούταν το δείγμα που λαμβανόταν κάθε φορά και συγκρινόταν με την αρχική του κατάσταση (πρότυπο), καθώς και μεταξύ των τριών περιπτώσεων (broth, υπερκείμενο, μικροοργανισμός) σε κάθε θερμοκρασία. Είναι εμφανές ότι η οργανοληπτική αξιολόγηση μη εκπαιδευμένων ατόμων επιφέρει αποκλίσεις στα τελικά συμπεράσματα, διότι βασίζεται σε προσωπικές προτιμήσεις, αλλά και σε άλλους παράγοντες, όπως η λήψη τυχαίου ελαττωματικού δείγματος, ο φωτισμός του χώρου ή άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες.

2.6 Εφαρμογή πολυφασματικής απεικόνισης (Multispectral Imaging, MSI)

Για τις ανάγκες της δειγματοληψίας, μέρος του δείγματος μεταφερόταν σε τρυβλίο, με σκοπό τη λήψη των αντίστοιχων εικόνων. Για τη λήψη πολυφασματικών εικόνων, χρησιμοποιήθηκε το όργανο VideometerLab, το οποίο λαμβάνει εικόνες σε 18 διαφορετικά και μη ομοιόμορφα κατανεμημένα μήκη κύματος από UV (405 nm) έως NIR μικρού μήκους (970 nm). Συγκεκριμένα, τα μήκη κύματος είναι τα εξής: 405, 430, 450, 470, 505, 565, 590, 630, 645, 660, 850, 870, 890, 910, 920, 940, 950 και 970 nm (Panagou et al., 2014). Το Τεχνικό Πανεπιστήμιο της Δανίας εφηύρε την τεχνολογία και η Videometer A/S είναι η εταιρεία που την εμπορεύτηκε.



Εικόνα 2.7 Δειγματοληψία με VideometerLab

Το δείγμα του μαρουλιού στο τρυβλίο petri τοποθετήθηκε εντός της σφαίρας Ulbricht, η οποία διαθέτει μια κάμερα εσωτερικά στο πάνω μέρος και το εσωτερικό της είναι βαμμένο λευκό ώστε να επιτρέπει την ομοιόμορφη διάχυση του φωτός. Περιμετρικά της σφαίρας, υπάρχουν LED τα οποία είναι τοποθετημένα αντιαδιαμετρικά και ανάβουν διαδοχικά με τη λήψη εικόνας, δίνοντας το αντίστοιχο μήκος κύματος στην εσωτερική κάμερα. Ως αποτέλεσμα, λαμβάνεται μια μονόχρωμη εικόνα με ακρίβεια 32 bit για κάθε τύπο LED, καταλήγοντας σε έναν υπερφασματικό κύβο ($1280 \times 960 \times 18$).

Μέσω της διαδικασίας light setup, πραγματοποιείται βαθμονόμηση του συστήματος μέσω του οποίου προετοιμάζονται οι δίοδοι εκπομπής ανάλογα με τον τύπο του αντικειμένου που πρόκειται να απεικονισθεί. Πριν την πρώτη χρήση του VideometerLab, με τη βοήθεια ενός δείγματος δημιουργείται μια πρότυπη απεικόνιση (autolight), η οποία ανακαλείται σε κάθε δειγματοληψία μέσω του light setup. Η βαθμονόμηση του συστήματος είναι ραδιομετρική και γεωμετρική βάση του είδους που καταγράφεται, εξασφαλίζοντας το βέλτιστο δυναμικό εύρος, τη μείωση σκιών και την αποφυγή παραμόρφωσης ειδώλων.

Η εικόνα που τελικώς λαμβάνεται περιέχει πληροφορίες μη σχετικές με την ανάλυση, όπως το τρυβλίο petri στο οποίο είναι τοποθετημένο το δείγμα. Επομένως, απαιτείται επεξεργασία πριν την εξαγωγή των εικόνων για την απομάκρυνση μη χρήσιμων πληροφοριών (segmentation). Η επεξεργασία πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος του VideometerLab (Videometer- Labversion 2.12.39, Videometer A/S, Denmark), στο οποίο η αντίθεση μεταξύ δείγματος και άλλων μη σχετικών αντικειμένων μεγιστοποιήθηκε. Επιπλέον, βασιζόμενοι στην κανονική διακριτική ανάλυση (Canonical Discriminal Analysis, CDA), αποδόθηκε τελικά μια εικόνα μόνο με τις περιοχές ενδιαφέροντος (Region of Interest, ROI) (Εικόνα 2.8) (Panagou et al., 2014; Tsakanikas et al., 2016; Wang et al., 2018; Spyrelli et al., 2020).

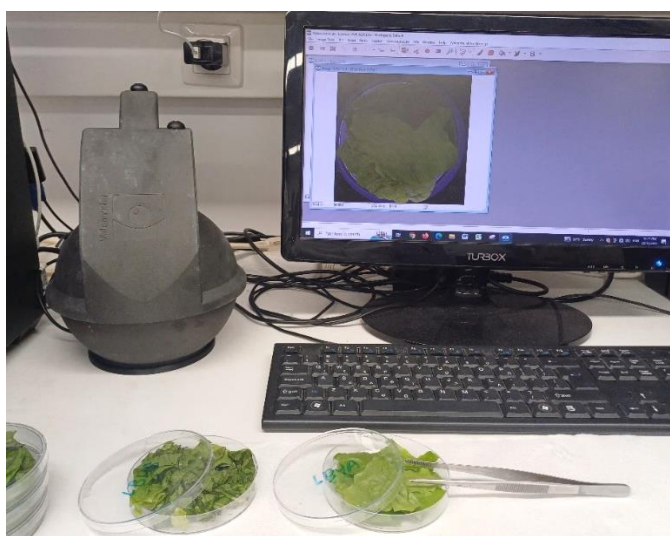


Εικόνα 2.8 Περιοχή ROI του δείγματος

Επιπρόσθετα, για τον εμπλουτισμό των δεδομένων πολυφασματικής απεικόνισης έγινε χρήση του οργάνου VideometerLite (Videometer A/S,Denmark). Το συγκεκριμένο όργανο ακολουθεί παρόμοια φιλοσοφία με το όργανο VideometerLab, με σημαντικά πλεονεκτήματα την ευκολία χρήσης, το χαμηλό κόστος και τη δυνατότητα εύκολης μεταφοράς.

Είναι ένα ασύρματο φορητό όργανο, το οποίο λαμβάνει εικόνες με μια συστοιχία 10 μηκών κύματος με εύρος από 405 nm έως 850 nm. Η ενσωματωμένη σφαίρα έχει διάμετρο 130 mm και επιτρέπει την ομοιόμορφη κατανομή του φωτός, ενώ η ακρίβεια απεικόνισης του δείγματος ανέρχεται στα 1520 x 1520 pixel ανά μήκος κύματος. Τα μήκη κύματος που περιλαμβάνονται στο VideometerLite είναι: 405 nm (Βιολετί), 460 nm (Μπλε), 525 nm (Κυανό), 590 nm (Κεχριμπάρι), 621 nm (Κόκκινο), 660 nm (Κόκκινο), 850 nm (NIR). Οι εικόνες μπορούν να ληφθούν σε διάστημα 7-10 δευτερολέπτων, επιτρέποντας ταχεία ανάλυση στο πεδίο, ενώ επιτρέπει τη σύνδεση με το λογισμικό VideometerLab. Στα πλεονεκτήματά του συγκαταλέγεται η μεγάλη διάρκεια ζωής των πηγών φωτός έως 100.000 ώρες. Χαρακτηρίζεται ως ευκολότερο στη χρήση, καθώς η βαθμονόμηση περιορίζεται στη σύνδεση του οργάνου με το αντίστοιχο προγράμματος στο συνδεδεμένο υπολογιστή, ενώ ταυτόχρονα περιλαμβάνει εύχρηστα κουμπιά για εκκίνηση και λήψη εικόνας.

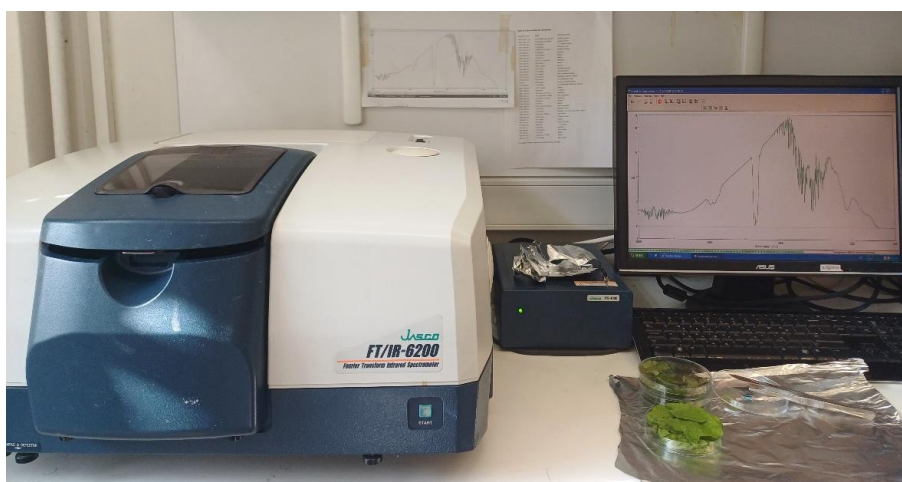
Τέλος, ακολουθήθηκε παρόμοια διαδικασία όπως αναφέρεται παραπάνω για το VideometerLab όσον αφορά την εξαγωγή των εικόνων (*VideometerLite - Videometer, n.d.*).



Εικόνα 2.9 Δειγματοληψία με VideometerLite

2.7 Εφαρμογή φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR)

Από τα τρυβλία από τα οποία πάρθηκαν πολυφασματικές εικόνες, χρησιμοποιήθηκε επαρκές δείγμα για την εφαρμογή φασματοσκοπίας υπέρυθρου με σχηματισμό Fourier. Τα δείγματα τοποθετούνταν σε κρύσταλλο ZnSe 45 ° HATR - Horizontal Attenuated Total Reflectance (PIKE Technologies, Madison, Wisconsin, United States) και οι μετρήσεις FTIR έγιναν με τη χρήση του φασματοφωτόμετρου FT / IR 6200 JASCO (Jasco Corp., Tokyo, Japan). Σχετικά με τα χαρακτηριστικά του κρυστάλλου, ο δείκτης διάθλασης ήταν 2.4 και το βάθος διείσδυσης 2.0 μm στα 1000.



Εικόνα 2.10 Φασματοφωτόμετρο FTIR-6200 JASCO

Κάθε φορά πριν την έναρξη της δειγματοληψίας και μετά από 4 δείγματα, λαμβάνονταν φάσμα αναφοράς (background) σε κενό, καθαρό κρύσταλλο. Ο κρύσταλλος καθαριζόταν αρχικά με απιονισμένο σαπουνόνερο, έπειτα με απιονισμένο νερό και τέλος με ακετόνη, ενώ στέγνωσε με τη χρήση μπατονέτας. Για τη δειγματοληψία, με τη χρήση λαβίδας και νυστεριού τα φύλλα του μαρουλιού κόβονταν σε μικρά κομμάτια, τέτοια ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη επαφή δείγματος και επιφάνειας κρυστάλλου. Το δείγμα μεταφερόταν με τη χρήση λαβίδας στην επιφάνεια του κρυστάλλου και επικαλύπτονταν με αλουμινόχαρτο. Το φασματοφωτόμετρο ήταν συνδεδεμένο σε υπολογιστή (Εικόνα 2.10) με πρόγραμμα Spectra Manager™ Code of Federal Regulations (CFR) software version 2 (Jasco Corp.). Κάθε φάσμα συλλεγόταν σε χρονικό διάστημα 2 λεπτών και πραγματοποιούνταν 100 σαρώσεις σε κάθε δείγμα. Το εύρος των φασμάτων ήταν από 4000 έως 400 cm^{-1} .

2.8 Ανάλυση φασματοσκοπικών δεδομένων

Τα φασματοσκοπικά δεδομένα που συλλέχθηκαν από τα παραπάνω όργανα υποβλήθηκαν σε περαιτέρω αναλύσεις, με σκοπό την εκτίμηση του μικροβιακού φορτίου των δειγμάτων των RTE σαλατών μαρουλιού.

2.8.1 Γραμμική παλινδρόμηση με τη μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Regression – PLS-R)

Τα δεδομένα που πάρθηκαν από τα παραπάνω πειράματα μελέτης της αλλοίωσης των RTE σαλατών μαρουλιού, από τη χρήση φασματοσκοπίας FTIR και από τη χρήση πολυφασματικής απεικόνισης, χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη μοντέλων γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) για την εκτίμηση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας (OMX). Στόχος της PLSR είναι η πρόβλεψη ενός συνόλου εξαρτημένων μεταβλητών από ένα σύνολο ανεξάρτητων μεταβλητών. Συγκεκριμένα, η συγκεκριμένη μέθοδος βασίζεται στη γραμμική συσχέτιση δυο συνόλων δεδομένων X (ανεξάρτητη μεταβλητή) και Y (εξαρτημένη μεταβλητή), σε έναν νέο χώρο, στο οποίο δημιουργούνται νέες ανεξάρτητες και εξαρτημένες μεταβλητές (X -scores) σε ορθογώνια διάταξη. Παράλληλα προκύπτουν λανθάνουσες μεταβλητές (Latent Variables, LVs), οι οποίες ερμηνεύουν την μέγιστη διασπορά στην απόκριση (Wold et al., 2001; Panagou et al., 2014). Ο προσδιορισμός της σωστής πολυπλοκότητας του μοντέλου είναι καθοριστικός στην εμπειρική μοντελοποίηση. Με πολυάριθμες και συσχετισμένες μεταβλητές X , η υπερ-προσαρμογή (overfitting) ενέχει σημαντικό κίνδυνο, αποδίδοντας ένα καλά προσαρμοσμένο μοντέλο με περιορισμένη προγνωστική ισχύ. Επομένως, η αυστηρή δοκιμή της προγνωστικής σημασίας κάθε στοιχείου PLS είναι επιτακτική, έτσι ώστε σταματά όταν τα στοιχεία γίνονται μη σημαντικά. Η διασταυρούμενη επικύρωση (Cross-Validation, CV) αναδεικνύεται ως μια αξιόπιστη μέθοδος για την αξιολόγηση της προγνωστικής σημασίας, που περιλαμβάνει τη διαίρεση δεδομένων σε πολλές ομάδες και την ανάπτυξη παράλληλων μοντέλων με μία ομάδα να παραλείπεται. Η χρησιμότητα του PLSR έγκειται στην ικανότητά του να αναλύει δεδομένα με πολυάριθμες, θορυβώδεις και συσχετιζόμενες μεταβλητές τόσο στο X όσο και στο Y . Συγκεκριμένα, το PLSR παρουσιάζει πλεονέκτημα στην ακρίβεια των παραμέτρων του μοντέλου, η οποία ενισχύεται με έναν αυξανόμενο αριθμό σχετικών μεταβλητών και παρατηρήσεων (Wold et al., 2001; Esposito Vinzi et al., 2010). Η μέθοδος έχει λάβει ευρεία ανταπόκριση καθώς ο αλγόριθμος έχει γίνει ένα τυπικό εργαλείο για την επεξεργασία ενός ευρέος φάσματος

προβλημάτων χημικών δεδομένων και έχει οδηγήσει στην εφαρμογή της σε ποικίλους επιστημονικούς τομείς, όπως για παράδειγμα στη βιοπληροφορική, στα τρόφιμα, την ιατρική, τη φαρμακολογία, κ.α.(Rosipal & Krämer, 2006).

Στη συγκεκριμένη μελέτη, τα ληφθέντα φασματοσκοπικά δεδομένα των τριών οργάνων αντιστοιχήθηκαν με τα μικροβιολογικά δεδομένα (OMX). Συγκεκριμένα για όργανο FTIR, τα δεδομένα επεξεργάστηκαν στην περιοχή των κυματαρίθμων από 1800 έως 870 cm^{-1} , η οποία αντιστοιχεί στην περιοχή ενδιαφέροντος για την αλλοίωση φυλλωδών λαχανικών σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Shah et al., 2019; Manthou et al., 2022). Ως ανεξάρτητες μεταβλητές θεωρήθηκαν οι κυματάριθμοι των φασματοσκοπικών δεδομένων και ως εξαρτημένες μεταβλητές τα δεδομένα της OMX, σε όλα τα όργανα. Με τη χρήση του λογισμικού XLSTAT® software (version 2023.3.1, Addinsoft, New York) εφαρμόστηκε γραμμική παλινδρόμηση με τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων και τρία μοντέλα, τα οποία αντιστοιχούν στα τρία όργανα. Περίπου το 70% του συνόλου των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη (Calibration) και εσωτερική επικύρωση (Full Cross Validation) του μοντέλου ενώ το υπόλοιπο 30% για την πρόβλεψη/εξωτερική επικύρωση (Prediction) των μοντέλων.

Τα μοντέλα προσδιορισμού OMX με την μέθοδο PLS-R αξιολογήθηκαν μέσω των παραμέτρων συσχέτισης που υπολογίζονται αυτόματα μετά την εξαγωγή του μοντέλου. Αυτοί οι παράμετροι είναι η ρίζα του μέσου τετραγωνικού σφάλματος (Root Mean Square Error, RMSE) και ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2), οι οποίοι δείχνουν την ικανοποιητική ή μη απόδοση του μοντέλου σε σύγκριση μεταξύ τους.

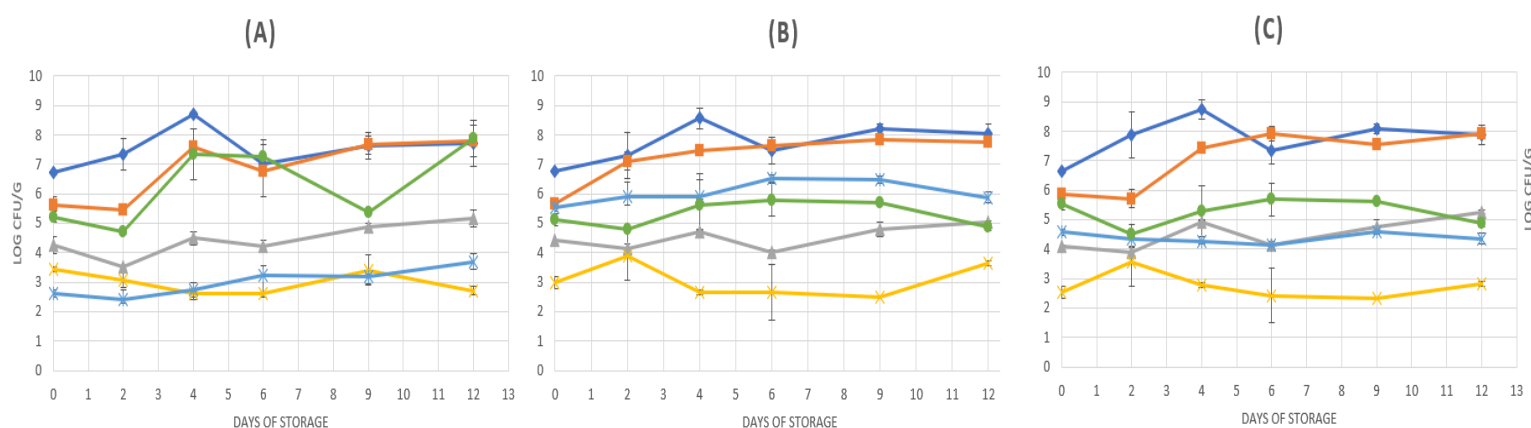
3. Αποτελέσματα και συζήτηση

3.1 Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων

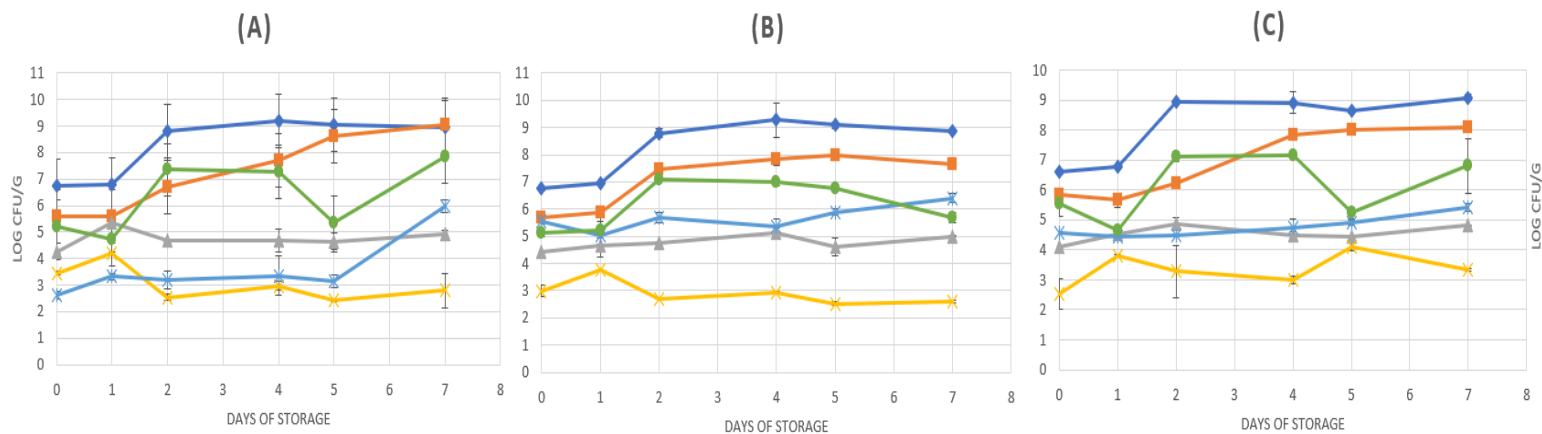
Παρακάτω παρατίθενται διαγράμματα, στα οποία υποδηλώνεται ο πληθυσμός των μικροοργανισμών που μελετήθηκαν στις δυο θερμοκρασίες υπό συνθήκες τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Παρουσιάζονται και οι τρεις περιπτώσεις (Control, Free Cells, Supernatant) των δύο παθογόνων που εξετάστηκαν (*L. monocytogenes*, *E. coli*). Στις δύο θερμοκρασίες αποθήκευσης των δειγμάτων (4, 10 °C), μελετήθηκαν εκτός της OMX και των παθογόνων, τα γαλακτικά βακτήρια, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν και ως βιο-προστασία, το γένος *Pseudomonas* spp., τα εντεροβακτήρια και οι ζύμες/ μύκητες. Ως ημέρα αποθήκευσης 'μηδέν', αναφέρεται η ημέρα παραλαβής, συσκευασίας και εμβολιασμού των δειγμάτων. Η δειγματοληψία τερματιζόταν αφού το δείγμα απορριπτόταν οργανοληπτικά για οποιονδήποτε λόγο.

3.1.1 Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων των εμβολιασμένων δειγμάτων με *Listeria monocytogenes*

Τα Διαγράμματα (3.1-3.2) που παρατίθενται αφορούν τα δείγματα εμβολιασμένα με *Listeria monocytogenes* και για τις 3 περιπτώσεις ψεκασμού στις δυο θερμοκρασίες συντήρησης.



Διάγραμμα 3.1 Μετρήσεις και τυπικές αποκλίσεις (\pm) για την συντήρηση RTE σαλάτας μαρουλιού εμβολιασμένη με *L. monocytogenes* υπό συνθήκες MAP στους 4°C για (a): Control, (b): Free Cells και (c): Supernatant. (●) OMX, (●) *Pseudomonas* spp., (●) ζύμες/ μύκητες, (●) *L. monocytogenes*, (●) LAB, (●) *Enterobacteriaceae*



Διάγραμμα 3.2 Μετρήσεις και τυπικές αποκλίσεις (\pm) για την συντήρηση RTE σαλάτας μαρουλιού στους 10°C εμβολιασμένη με *L. monocytogenes* υπό συνθήκες MAP για (a): Control, (b): Free Cells και (c): Supernatant. (●)OMX, (◻)Pseudomonas spp., (▲)ζύμες/ μύκητες, (★)L. monocytogenes, (◐)LAB, (◑)Enterobacteriaceae

Σε όλες τις περιπτώσεις ο εναρκτήριο μικροβιακός πληθυσμός OMX ανέρχεται περίπου στο $6.7 \log \text{ cfu/g}$. Στα παραπάνω Διαγράμματα 3.1-3.2, αποτυπώνονται ως κύριοι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί για τις σαλάτες μαρουλιού είναι το γένος *Pseudomonas* spp. και τα εντεροβακτήρια. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται από την βιβλιογραφία, σύμφωνα με την οποία οι ψευδομονάδες και τα εντεροβακτήρια οφείλονται κατά κύριο λόγο στην αλλοίωση φυλλωδών των λαχανικών (Lopez-Velasco et al., 2011; Tsironi et al., 2017; Karpetanakou et al., 2019).

Το γένος *Pseudomonas* spp. επικράτησε από την αρχή έως το τέλος συντήρησης σε κάθε περίπτωση. Πιο συγκεκριμένα, ξεκινώντας από $5.61 \pm 0.31 \log \text{ cfu/g}$ για την περίπτωση του control, $5.67 \pm 0.06 \log \text{ cfu/g}$ για τα ελεύθερα κύτταρα και $5.84 \pm 0.13 \log \text{ cfu/g}$ για το supernatant, στην χαμηλή θερμοκρασία συντήρησης (4°C) και μετά από δώδεκα ημέρες, οι ψευδομονάδες αυξήθηκαν περίπου κατά 2 λογάριθμους (7.79 ± 0.52 , 7.74 ± 0.03 , 7.92 ± 0.24 αντίστοιχα). Οι παραπάνω τιμές θεωρούνται ως φυσιολογικές για το μαρούλι, καθώς σύμφωνα με τους Oliveira et al (2010), το γένος *Pseudomonas* spp. κυμαίνεται περίπου στα 5 με $7 \log \text{ cfu/g}$. Στην υψηλή θερμοκρασία συντήρησης (10°C), στο τέλος της δειγματοληψίας, δηλαδή μετά το πέρας μιας εβδομάδας, στην περίπτωση του control ο πληθυσμός των ψευδομονάδων ανερχόταν στα $9.04 \pm 0.43 \log \text{ cfu/g}$ και στην περίπτωση του supernatant στα $8.11 \pm 0.04 \log \text{ cfu/g}$, πράγμα που ξεπερνά ο εύρος των φυσιολογικών τιμών. Αντίθετα στην περίπτωση του ψεκασμού με ελεύθερα κύτταρα του *L. pentosus* FMCC B281, ο πληθυσμός των ψευδομονάδων ($7.65 \pm 0.19 \log \text{ cfu/g}$) δεν παρουσίασε παρόμοια αύξηση με τις άλλες δυο περιπτώσεις.

Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να θεωρηθεί ως επίδραση του *L.pentosus* FMCC B281 στην ανάπτυξη των ψευδομονάδων, περισσότερο με την χρήση των ελεύθερων κυττάρων και αμέσως λιγότερο από το supernatant του, συγκριτικά με την περίπτωση που απουσιάζει η βιοσυντήρηση (control).

Κυρίαρχος πληθυσμός των δειγμάτων ήταν επίσης και η οικογένεια Enterobacteriaceae, ο οποίος στους 4°C υπολογίστηκε περίπου στους 5 log cfu/g παρουσιάζοντας μικρές διακυμάνσεις μεταξύ των περιπτώσεων. Οι τιμές των εντεροβακτηρίων για την χαμηλή θερμοκρασία συντήρησης ανταποκρίνονται στα εύρη τιμών προηγούμενων αναφορών για φυλλώδη λαχανικά και συγκριμένα για το μαρούλι (Fröder et al., 2007; Oliveira et al., 2010; Uhlig et al., 2022). Ωστόσο στους 10°C, στην περίπτωση του control, τα εντεροβακτήρια εκτοξευθήκαν στα 7.87 ± 0.04 log cfu/g στο πέρας της δειγματοληψίας, ενώ στο supernatant δεν παρουσιάστηκε τόσο μεγάλη αύξηση των εντεροβακτηρίων (6.82 ± 0.63 log cfu/g) και ακόμη μικρότερη αύξηση διαπιστώθηκε στα ελεύθερα κύτταρα (5.7 ± 0.18 log cfu/g).

Ομοίως, στην σταδιακή μείωση των εντεροβακτηρίων στους 10°C πιθανολογείται ότι συνέβαλε η παρουσία *L.pentosus* FMCC B281 και του supernatant του.

Οι ζύμες και οι μύκητες δεν παρουσίασαν διαφορές, κυμάνθηκαν σε εύρος 4-5 log cfu/g σε κάθε περίπτωση, γεγονός που επιβεβαιώνεται από προηγούμενες έρευνες (Tournas, 2005; Oliveira et al., 2010). Όπως αποδεικνύεται από την πειραματική διαδικασία, οι ζύμες και οι μύκητες δεν επηρεάστηκαν από την θερμοκρασία συντήρησης αλλά ούτε και από την βιο-προστασία του *L. pentosus* FMCC B281. Έτσι, ταυτόχρονα επιβεβαιώνεται η αντοχή και ανθεκτικότητα των ζυμών και μυκήτων σε διάφορες συνθήκες όπως έχει προαναφερθεί (1.4 Μικροβιακή Χλωρίδα) (Tournas et al., 2001).

Όσον αφορά τον εμβολιασμό με *Listeria monocytogenes*, πραγματοποιήθηκε με αρχικό πληθυσμό 10^3 και αυτό αποδεικνύεται από τις αρχικές μετρήσεις σε κάθε περίπτωση (3.44 ± 0.12 log cfu/g για το control, 2.99 ± 0.22 log cfu/g για τα ελεύθερα κύτταρα, 2.54 ± 0.52 log cfu/g για το supernatant). Στους 4°C συντήρησης του δείγματος, δεν παρατηρήθηκε κάποια επίδραση του γαλακτικού βακτηρίου ως βιο-προστασία των δειγμάτων έναντι της ανάπτυξης του παθογόνου. Αυτό μπορεί να οφείλεται και στο γεγονός πως η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης της *Listeria monocytogenes* είναι οι θερμοκρασίες ψύξης όπως έχει προαναφερθεί. Παρόμοιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και στην υψηλότερη θερμοκρασία

συντήρησης, πράγμα που σε αυτή την περίπτωση αποδεικνύει την απουσία δράσης των γαλακτικών βακτηρίων έναντι του παθογόνου.

Σύμφωνα με τους Webb et al. (2022), είναι σημαντικό να δοκιμάζεται, πριν την χρήση του στο τρόφιμο, η επίδραση του γαλακτικού βακτηρίου έναντι της *Listeria monocytogenes*. Ωστόσο, σημαντικότερο ρόλο διαδραματίζει η μήτρα του τροφίμου, η οποία επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την αντιμικροβιακή δράση του γαλακτικού βακτηρίου. Συνεπώς, τα αποτελέσματα της επίδρασης των LAB έναντι της *Listeria monocytogenes* διαφέρουν σε πειραματική δοκιμή και στην εφαρμογή πάνω στο τρόφιμο.

Το γαλακτικό βακτήριο *L.pentosus* FMCC B281 απέδωσε προβιοτικό χαρακτήρα στο τρόφιμο, διότι καθ' όλη την διάρκεια συντήρησης των δειγμάτων, η περίπτωση ψεκασμού με τα ελεύθερα κύτταρά του, διατήρησε περισσότερα από 2 log cfu/g συγκριτικά με τα δείγματα του control. Πιο συγκεκριμένα για τους 4°C, ξεκινώντας από 2.62 ± 0.12 log cfu/g στο πέρας τις διαδικασίας τα γαλακτικά βακτήρια αυξήθηκαν κατά ένα λογάριθμο (3.67 ± 0.3 log cfu/g) στο control. Παρόμοια τάση δεν παρατηρήθηκε στους 10°C, καθώς τα γαλακτικά βακτήρια σημείωσαν ραγδαία αύξηση στα 5.99 ± 0.23 log cfu/g στο τέλος της δειγματοληψίας. Στην περίπτωση του ψεκασμού με το supernatant, τα γαλακτικά βακτήρια είχαν ως αρχικό πληθυσμό 4.58 ± 0.03 log cfu/g, τα οποία δεν παρουσίασαν διαφοροποίηση (4.36 ± 0.55 log cfu/g) στην χαμηλή θερμοκρασία συντήρησης, ενώ στους 10°C αυξήθηκαν κατά ένα λογάριθμο (5.42 ± 0.25 log cfu/g). Η περίπτωση των ελεύθερων κυττάρων είναι χαρακτηριστική για τα γαλακτικά βακτήρια, καθώς ο εναρκτήριο πληθυσμός τους ήταν στα 5.53 ± 0.09 log cfu/g και διατηρήθηκε σε υψηλά επίπεδα κατά την διάρκεια τις δειγματοληψίας και για τις δύο θερμοκρασίες (5.88 ± 0.18 log cfu/g για 4°C, 6.39 ± 0.61 log cfu/g για 10°C).

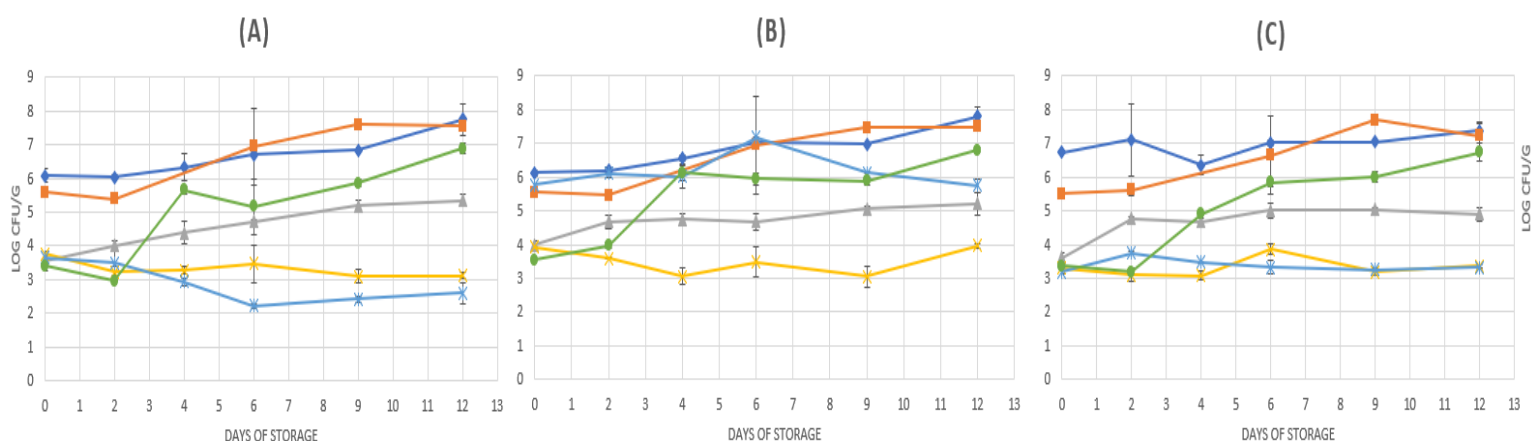
Τέλος, εκτιμώντας συνολικά τον μικροβιακό πληθυσμό των RTE σαλατών, η OMX είχε ως αρχικό πληθυσμό 6.73 ± 0.08 log cfu/g, 6.75 ± 0.06 log cfu/g και 6.62 ± 0.08 log cfu/g, για την περίπτωση του control, των ελεύθερων κυττάρων και του υπερκείμενου αντίστοιχα. Οι παραπάνω μετρήσεις ανταποκρίνονται πλήρως στην ολική μεσόφιλη χλωρίδα του μαρουλιού, όπως αποδεικνύεται από προηγούμενες μετρήσεις ερευνών για δείγματα φρέσκο-κομμένου μαρουλιού στις οποίες υπολογίζεται περίπου στα 5-7 log cfu/g (Oliveira et al., 2010; Arienzo et al., 2020). Μετά από δώδεκα μέρες αποθήκευσης στους 4°C, η OMX ανήλθε στα 7.71 ± 0.08 log cfu/g για το control, στα 8.05 ± 0.07 log cfu/g για τα ελεύθερα κύτταρα και 7.88 ± 0.08 log cfu/g για το supernatant, ενώ μετά από επτά μέρες

συντήρησης στους 10°C η OMX ήταν κατά 2-2.5 λογάριθμους αυξημένη από τον εναρκτήριο πληθυσμό ($8.96 \pm 0.12 \log \text{ cfu/g}$, $8.87 \pm 0.02 \log \text{ cfu/g}$, $9.09 \pm 0.10 \log \text{ cfu/g}$ για τις αντίστοιχες περιπτώσεις).

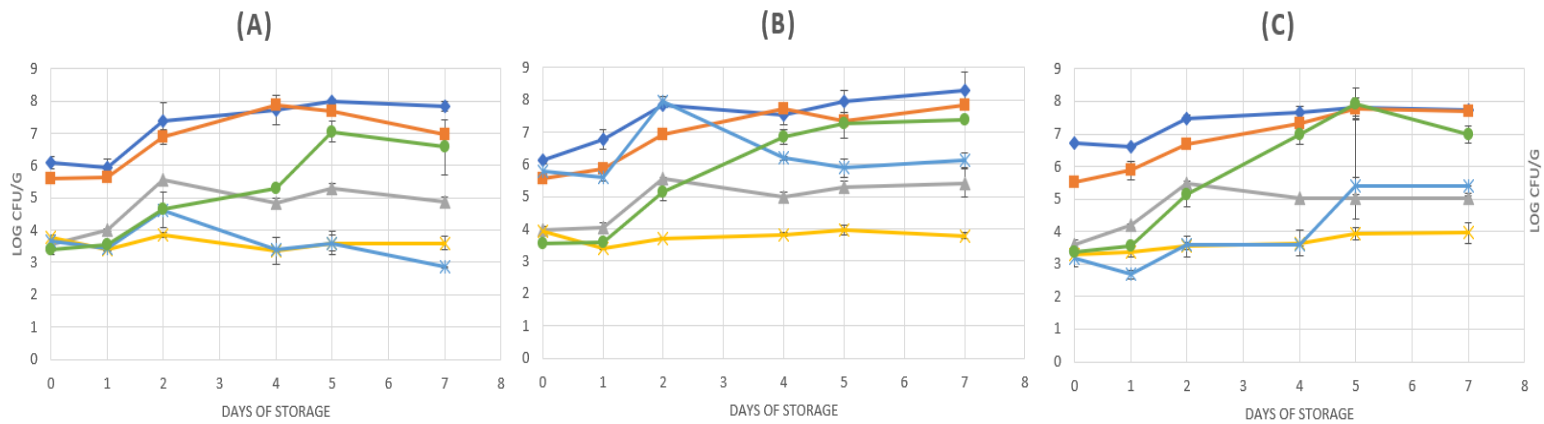
Στην παράταση του χρόνου ζωής των δειγμάτων συνέβαλε εμφανώς η θερμοκρασία συντήρησης (4°C), χάρη στην οποία τα δείγματα διατηρήθηκαν περισσότερες μέρες με μικρότερο μικροβιακό συνολικό πληθυσμό και χαμηλότερο πληθυσμό των κύριων αλλοιογόνων μικροοργανισμών (*Pseudomonas*, Enterobacteriaceae) (Διάγραμμα 3.1) συγκριτικά με την υψηλότερη θερμοκρασία αποθήκευσης (Διάγραμμα 3.2). Επιπλέον, παρατηρήθηκε βελτίωση των μικροβιακών πληθυσμών σε ορισμένα δείγματα τα οποία ήταν ψεκασμένα πρωτίστως με τα ελεύθερα κύτταρα του *L.pentosus* FMCC B281 και έπειτα με το υπερκείμενό του. Έτσι, η βιο-προστατευτική καλλιέργεια συνέβαλε στην παράταση του χρόνου ζωής (shelf-life), διατηρώντας ταυτόχρονα το επίπεδο ασφάλειας.

3.1.2 Αποτελέσματα μικροβιολογικών αναλύσεων των εμβολιασμένων δειγμάτων με *E.coli*

Παρακάτω παρατίθενται τα Διαγράμματα 3.3-3.4, στα οποία παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων για τα δείγματα μαρουλιού εμβολιασμένα με *E.coli*, για τις τρεις περιπτώσεις ψεκασμού (control, ελεύθερα κύτταρα, supernatant) στις δυο διαφορετικές θερμοκρασίες συντήρησης.



Διάγραμμα 3.3 Μετρήσεις και τυπικές αποκλίσεις (\pm) για την συντήρηση RTE σαλάτας μαρουλιού εμβολιασμένη με *E. coli* υπό συνθήκες MAP στους 4°C για (a): Control, (b): Free Cells και (c): Supernatant. (●)OMX, (●)Pseudomonas spp., (●)ζύμες / μύκητες, (●)E.coli, (●)LAB, (●)Enterobacteriaceae



Διάγραμμα 3.4 Μετρήσεις και τυπικές αποκλίσεις (\pm) για την συντήρηση RTE σαλάτας μαρουλιού εμβολιασμένη με *E. coli* υπό συνθήκες MAP στους 10°C για (a): Control, (b): Free Cells και (c): Supernatant. (●)OMX, (●)Pseudomonas spp., (●)ζύμες / μύκητες, (●)E.coli, (●)LAB, (●)Enterobacteriaceae

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω διαγράμματα για όλες τις περιπτώσεις και στις δύο θερμοκρασίες ο εναρκτήριο πληθυσμός της OMX ($\sim 6 \log \text{ cfu/g}$) ανέρχεται περίπου στα ίδια επίπεδα όπως στα εμβολιασμένα δείγματα με *L.monocytognes* ($\sim 6.7 \log \text{ cfu/g}$). Ταυτόχρονα αποδεικνύεται για μια ακόμα φορά ότι οι κύριοι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί του μαρουλιού είναι πρωτίστως το γένος *Pseudomonas* και έπειτα μέλη της οικογένειας Enterobacteriaceae (Διαγράμματα 3.3-3.4), γεγονός που αναφέρεται και στην βιβλιογραφία (Lopez-Velasco et al., 2011; Tsironi et al., 2017; Kapetanakou et al., 2019). Σε ένα γενικότερο πλαίσιο, παρατηρείται παρόμοια πληθυσμιακή τάση των μικροοργανισμών που καταμετρήθηκαν στα εμβολιασμένα δείγματα των δύο παθογόνων (Διαγράμματα 3.1-3.4).

Τα εμβολιασμένα δείγματα μαρουλιού με *E.coli* παρουσίασαν OMX ίση με $6.09 \pm 0.2 \log \text{ cfu/g}$ για την περίπτωση του control, $6.13 \pm 0.09 \log \text{ cfu/g}$ για τον ψεκασμό με ελεύθερα κύτταρα του γαλακτικού βακτηρίου και $6.72 \pm 0.01 \log \text{ cfu/g}$ για τον ψεκασμό με το supernatant. Όπως προαναφέρθηκε, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, η OMX του μαρουλιού ισούται περίπου από 5 έως $7 \log \text{ cfu/g}$ (Oliveira et al., 2010; Arienzo et al., 2020), γεγονός που επιβεβαιώνει τις αρχικές τιμές του. Στην συνέχεια και για τις δύο θερμοκρασίες, η OMX αυξήθηκε περίπου κατά 1-1.5 $\log \text{ cfu/g}$ στο τέλος κάθε δειγματοληψίας με χρόνο επώασης ανάλογα με την θερμοκρασία. Η περίπτωση που διαφοροποιείται είναι αυτή των ελεύθερων κυττάρων στους 10°C , στην οποία η OMX ανήλθε στα $8.28 \pm 0.19 \log \text{ cfu/g}$. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη των ελεύθερων κυττάρων του γαλακτικού βακτηρίου που αυξάνουν τον συνολικό πληθυσμό του δείγματος.

Το γένος *Pseudomonas* ήταν ο επικρατέστερος μικροβιακός πληθυσμός και σε αυτόν τον πειραματικό κύκλο. Σε αντίθεση με την περίπτωση εμβολιασμού των δειγμάτων με *L. monocytogenes*, δεν παρουσιάστηκε ραγδαία αύξηση του πληθυσμού σε ορισμένα δείγματα. Συγκεκριμένα, ξεκινώντας από $5.6 \pm 0.05 \log \text{ cfu/g}$, $5.56 \pm 0,04 \log \text{ cfu/g}$ και $5.51 \pm 0.11 \log \text{ cfu/g}$ για το control, τα ελεύθερα κύτταρα και το υπερκείμενο αντίστοιχα, ο πληθυσμός του γένους κυμάνθηκε στους 4°C αυξήθηκε κατά $2 \log \text{ cfu/g}$ περίπου σε όλες τις περιπτώσεις ($7.55 \pm 0.65 \log \text{ cfu/g}$, $7.5 \pm 0.05 \log \text{ cfu/g}$ και $7.22 \pm 0.37 \log \text{ cfu/g}$ αντίστοιχα για τα παραπάνω) στο τέλος της δειγματοληψίας. Ομοίως δεν παρατηρήθηκαν μεγάλες διακυμάνσεις στους 10°C , στους οποίους την μικρότερη τιμή εμφάνισε το control ($6.94 \pm 0.11 \log \text{ cfu/g}$) και ακολούθησαν οι άλλες δύο περιπτώσεις με παρόμοιες τιμές ($7.85 \pm 0.17 \log \text{ cfu/g}$ για τα ελεύθερα κύτταρα και $7.71 \pm 0.13 \log \text{ cfu/g}$ για το supernatant).

Ο πληθυσμός της οικογένειας *Enterobacteriaceae* παρουσίασε την μεγαλύτερη αύξηση πληθυσμού από την αρχή μέχρι το τέλος τη δειγματοληψίας για όλα τα δείγματα και στις δύο θερμοκρασίες συντήρησης. Το αποτέλεσμα αυτό είναι λογικό και αναμενόμενο καθώς όλα τα δείγματα ήταν εμβολιασμένα με δυο στελέχη *E. coli* (FMCC B298 & FMCC B290), το οποίο ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae* (Osaili et al., 2018). Στην αρχή της δειγματοληψίας, τα εντεροβακτήρια ήταν σε χαμηλά επίπεδα ($\sim 3.4 \log \text{ cfu/g}$) και στις 3 περιπτώσεις δειγμάτων. Στο πέρας της δειγματοληψίας για τους 4°C , τα εντεροβακτήρια αυξήθηκαν περισσότερο από 3 λογάριθμους σε κάθε περίπτωση ($6.89 \pm 0.15 \log \text{ cfu/g}$ για το control, $6.8 \pm 0.05 \log \text{ cfu/g}$ για τα ελεύθερα κύτταρα και $6.74 \pm 0.26 \log \text{ cfu/g}$ για το supernatant). Παρόμοια εικόνα παρουσιάστηκε και στους 10°C στο τέλος της δειγματοληψίας, καθώς τα εντεροβακτήρια αυξήθηκαν σε $6.56 \pm 0.08 \log \text{ cfu/g}$ για το control και $6.74 \pm 0.08 \log \text{ cfu/g}$ για το supernatant, ενώ λίγο περισσότερο αυξήθηκαν στην περίπτωση των ελεύθερων κυττάρων ($7.3 \pm 0.05 \log \text{ cfu/g}$).

Σχετικά με τον παθογόνο μικροοργανισμό που εμβολιάστηκαν τα δείγματα RTE σαλάτας μαρουλιού, έχοντας ως αρχικό πληθυσμό περίπου τα $3 \log \text{ cfu/g}$, το οποίο επιβεβαιώνει την ποσότητα εμβολιασμού (10^3), δεν υπήρξε μεγάλη διακύμανση του πληθυσμού *E. coli* σε καμία από τις περιπτώσεις. Τα δείγματα που ήταν αποθηκευμένα στους 4°C και συγκεκριμένα οι περιπτώσεις των ελευθέρων κυττάρων και του supernatant δεν παρουσίασαν αυξομείωση του πληθυσμού από την αρχή έως το τέλος της δειγματοληψίας (από $3.792 \pm 0.03 \log \text{ cfu/g}$ σε $3.97 \pm 0.06 \log \text{ cfu/g}$ για τα ελευθέρως κύτταρα και από $3.3 \pm 0.17 \log \text{ cfu/g}$ σε $3.36 \pm 0.02 \log \text{ cfu/g}$ για το supernatant). Ωστόσο, στο control της χαμηλής θερμοκρασίας αποθήκευσης παρατηρήθηκε μικρή μείωση κατά $0.8 \log \text{ cfu/g}$,

συγκεκριμένα από $3.73 \pm 0.06 \log \text{ cfu/g}$ σε $3.12 \pm 0.06 \log \text{ cfu/g}$. Η παρουσία της βιοπροστασίας δεν φάνηκε να αποδίδει κάποιο αποτέλεσμα, ενώ η συντήρηση των δειγμάτων στους 4°C μείωσε την παρουσία του *E.coli* γεγονός που επιβεβαιώνεται σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA, 2011). Ο πληθυσμός *E.coli* σημείωσε μικρή αύξηση στα ψεκασμένα δείγματα με supernatant με συντήρηση στους 10°C , ξεκινώντας από $3.29 \pm 0.13 \log \text{ cfu/g}$ κατέληξε σε $3.96 \pm 0.33 \log \text{ cfu/g}$. Οι άλλες δύο περιπτώσεις δεν παρουσίασαν διαφοροποιήσεις και κυμάνθηκαν περίπου στα $3.7 \log \text{ cfu/g}$.

Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια είναι πιο ανθεκτικά στα αντιμικροβιακά των γαλακτικών βακτηρίων λόγω της σύνθεσής τους, η οποία λόγω της εξωτερικής κυτταρικής μεμβράνης προστατεύει το κύτταρο από αντιμικροβιακούς παράγοντες (Barcenilla et al., 2023; Stupar et al., 2023). Έτσι, δικαιολογείται η ανθεκτικότητα του *E.coli* στην βιοσυντήρηση και η μη αποτελεσματικότητά του *L.pentosus* FMCC B281 έναντι του παθογόνου *E.coli* στα δείγματα του μαρουλιού. Ταυτόχρονα, η ανθεκτικότητα το γένους *Pseudomonas* επιβεβαιώνει τις παραπάνω μελέτες και στις δύο περιπτώσεις εμβολιασμού (Διαγράμματα 3.1-3.4), με αποτέλεσμα να παραμένει σε υψηλά επίπεδα ο κύριος αλλοιογόνος μικροβιακός πληθυσμός των φυλλωδών λαχανικών (Tsironi et al., 2017).

Οι ζύμες και οι μύκητες παρουσίασαν και σε αυτό τον κύκλο πειράματος μια σταθερή τάση από την αρχή έως το τέλος της δειγματοληψίας. Ο εναρκτήριο πληθυσμός ανήλθε περίπου στα $3.6 \log \text{ cfu/g}$ για όλες τις περιπτώσεις, ενώ δεν ξεπέρασε τα $5.2 \log \text{ cfu/g}$ στο τέλος της δειγματοληψίας στους 4°C και $5.4 \log \text{ cfu/g}$ στους 10°C . Οι τιμές αυτές είναι στα λογικά πλαίσια των τιμών για τα φυλλώδη λαχανικά σύμφωνα με τους Tournas (2005) και Oliveira et al. (2010). Ομοίως με τον κύκλο πειράματος έχοντας εμβολιασμένα δείγματα με *L. monocytogenes*, αποδεικνύεται η αντοχή και ανθεκτικότητα των ζυμών και μυκήτων σε διάφορες συνθήκες αφού δεν επηρεάστηκαν από την θερμοκρασία συντήρησης, ούτε από τα αντιμικροβιακά του *L. pentosus* FMCC B281.

Ομοίως με την περίπτωση εμβολιασμού των δειγμάτων με *L. monocytogenes*, τα γαλακτικά βακτήρια στην περίπτωση ψεκασμού με ελεύθερα κύτταρα είναι αυξημένα κατά 2 με 3 λογάριθμους συγκριτικά με τις άλλες δύο περιπτώσεις και στις δύο θερμοκρασίες, αποδίδοντας έτσι προβιοτικό χαρακτήρα στο τρόφιμο. Αναλυτικά, τα LAB διατηρήθηκαν στα $5.7 \log \text{ cfu/g}$ καθ' όλη την διάρκεια αποθήκευσης στους 4°C , για την περίπτωση των

ελεύθερων κυττάρων. Για την ίδια θερμοκρασία, στην περίπτωση ψεκασμού του υπερκειμένου του *L.pentosus* FMCC B281, τα γαλακτικά βακτήρια παρέμειναν περίπου στα 3.2 log cfu/g κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας, ενώ στο control μειώθηκαν κατά έναν λογάριθμο, από 3.66 ± 0.08 log cfu/g σε 2.61 ± 0.32 log cfu/g. Στους 10°C, παρόμοιες τιμές παρουσιάστηκαν στην έναρξη και την λήξη της δειγματοληψίας για το control, ενώ στο supernatant τα LAB σημείωσαν αύξηση από 3.19 ± 0.06 log cfu/g σε 5.39 ± 0.06 log cfu/g. Στην περίπτωση των ελεύθερων κυττάρων παρατηρήθηκε μικρή αύξηση, από 5.77 ± 0.25 log cfu/g σε 6.12 ± 0.09 log cfu/g.

Για μια ακόμη φορά, τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαιώνουν πως η δράση του *L.pentosus* FMCC B281 ως βιο-προστασία δεν είχε τα επιθυμητά αποτελέσματα όσον αφορά την ανάπτυξη του παθογόνου *E.coli*. Το γεγονός αυτό πιθανολογείται ότι είναι απόρροια της σύνθεσης των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων και της αντοχής τους έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων, όπως έχει προαναφερθεί. Ωστόσο, είναι προφανές ότι ο συνδυασμός βιοσυντήρησης και συσκευασίας MAP εξέτεινε την διάρκεια ζωής της έτοιμης προς κατανάλωση σαλάτας μαρουλιού, χωρίς να υποβαθμίσει το επίπεδο ασφάλειας.

3.2 Αποτελέσματα μέτρησης pH

Παρακάτω, στους Πίνακες 3.2 και 3.2, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων για την πρώτη και την τελευταία μέρα, καθώς δεν παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη διαφοροποίηση των τιμών στο ενδιάμεσο των δειγματοληψιών. Σε ένα γενικό πλαίσιο, το pH διατηρήθηκε σταθερό χωρίς διακυμάνσεις.

Το pH στην πλειονότητα των λαχανικών κυμαίνεται σε ένα εύρος από 5 έως 6.5 σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Francis et al., 2012; Erkmén & Bozoglu, 2016). Από τις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν καθ' όλη την διάρκεια και των δύο κύκλων πειραμάτων για κάθε περίπτωση, το pH κυμάνθηκε εντός του φυσιολογικού εύρους τιμών με ελάχιστες εξαιρέσεις.

Σε ορισμένες περιπτώσεις στις οποίες παρατηρείται μικρή διακύμανση των τιμών ενδεχομένως να οφείλεται στην απόκλιση του οργάνου μέτρησης, η οποία ανέρχεται στα ± 0.2 .

Πίνακας 3.1 Μετρήσεις και τυπικές αποκλίσεις (\pm) pH εμβολιασμένων δειγμάτων με *L. monocytogenes* για τις τρεις περιπτώσεις ψεκασμού (control, free cells, supernatant) στην αρχή (0 day) και το τέλος της δειγματοληψίας, στους 4°C (9 days) και 10°C (7days)

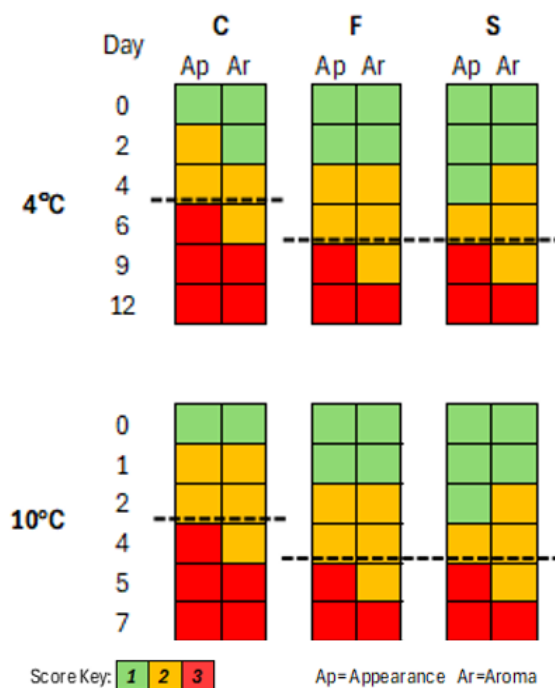
pH	0 day	end of sampling (4°C)	end of sampling (10°C)
Control	6.04 \pm 0.07	6.80 \pm 0.01	6.45 \pm 0.03
Free Cells	6.04 \pm 0.05	6.73 \pm 0.03	6.60 \pm 0.09
Supernatant	5.95 \pm 0.06	6.63 \pm 0.18	6.58 \pm 0.02

Πίνακας 3.2 Μετρήσεις και τυπικές αποκλίσεις (\pm) pH εμβολιασμένων δειγμάτων με *E.coli* για τις τρεις περιπτώσεις ψεκασμού (control, free cells, supernatant) στην αρχή (0 day) και το τέλος της δειγματοληψίας, στους 4°C (9 days) και 10°C (7days)

pH	0 day	end of sampling (4°C)	end of sampling (10°C)
Control	6.02 \pm 0.02	6.21 \pm 0.03	6.48 \pm 0.02
Free Cells	5.97 \pm 0.09	6.26 \pm 0.12	6.34 \pm 0.06
Supernatant	6.00 \pm 0.03	6.22 \pm 0.10	6.36 \pm 0.11

3.3 Αποτελέσματα οργανοληπτικής αξιολόγησης

Στον Πίνακα 3.3 παρατίθενται τα συνολικά αποτελέσματα της οργανοληπτικής αξιολόγησης, τα οποία βαθμολογήθηκαν σε κλίμακα από 1 έως 3 (1=αποδεκτό, 2=οριακά αποδεκτό, 3= απορριπτέο). Τα δείγματα αξιολογήθηκαν βάσει της συνολικής εμφάνισης (χρώμα, μάρανση, υφή) και της οσμής. Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα όλων των περιπτώσεων ψεκασμών των δειγμάτων στις δύο θερμοκρασίες.



Πίνακας 3.3 Αποτελέσματα οργανοληπτικής αξιολόγησης για τις περιπτώσεις ψεκασμού: control (C), ελεύθερα κύτταρα (F) και supernatant (S) στις δύο θερμοκρασίες συντήρησης (4 & 10 °C)

Είναι εμφανές ότι η χαμηλή θερμοκρασία συντήρησης και στις δυο περιπτώσεις παθογόνων εξέτεινε τον χρόνο ζωής των δειγμάτων μαρουλιού, συγκριτικά με τους 10°C.

Ωστόσο, αξιοσημείωτη περίπτωση είναι τα δείγματα control, τα οποία παρουσίασαν μεγάλη διαφοροποίηση στην εμφάνιση συγκριτικά με τα ψεκασμένα δείγματα με ελεύθερα κύτταρα και supernatant.

Όπως φαίνεται παρακάτω στην Εικόνα 3.1, η περίπτωση της βιοσυντήρησης απέδωσε βελτιωμένη εμφάνιση στα δείγματα, τα οποία είχαν ψεκαστεί είτε με υπερκείμενο είτε με την βιομάζα, αντίθετα με την περίπτωση του control, η οποία αντιστοιχεί στην απουσία βιο- προστασίας.

Επομένως, φαίνεται πως η ύπαρξη της βιοσυντήρησης συνέβαλε θετικά στην ποιότητα του προϊόντος, διατηρώντας περισσότερο την φρεσκάδα και την σκληρότητα των φύλλων μαρουλιού για περισσότερες ημέρες, αποτρέποντας την μάρανση όπως φυσιολογικά θα συνέβαινε. Επομένως, εκτός από το γεγονός πως διατηρείται η ασφάλεια του προϊόντος, όπως φαίνεται από τα μικροβιολογικά αποτελέσματα, η ύπαρξη βιο-προστασίας μέσω γαλακτικών βακτηρίων συμβάλει και στην ποιότητα του, παρατείνοντας τον χρόνο ζωής του.



Εικόνα 3.1 Εμβολιασμένα δείγματα με *E.coli* για τις περιπτώσεις ψεκασμού με ελεύθερα κύτταρα (αριστερά), *supernatant* (μέση) και *control* (δεξιά) στους 10°C μετά από 4 ημέρες συντήρησης

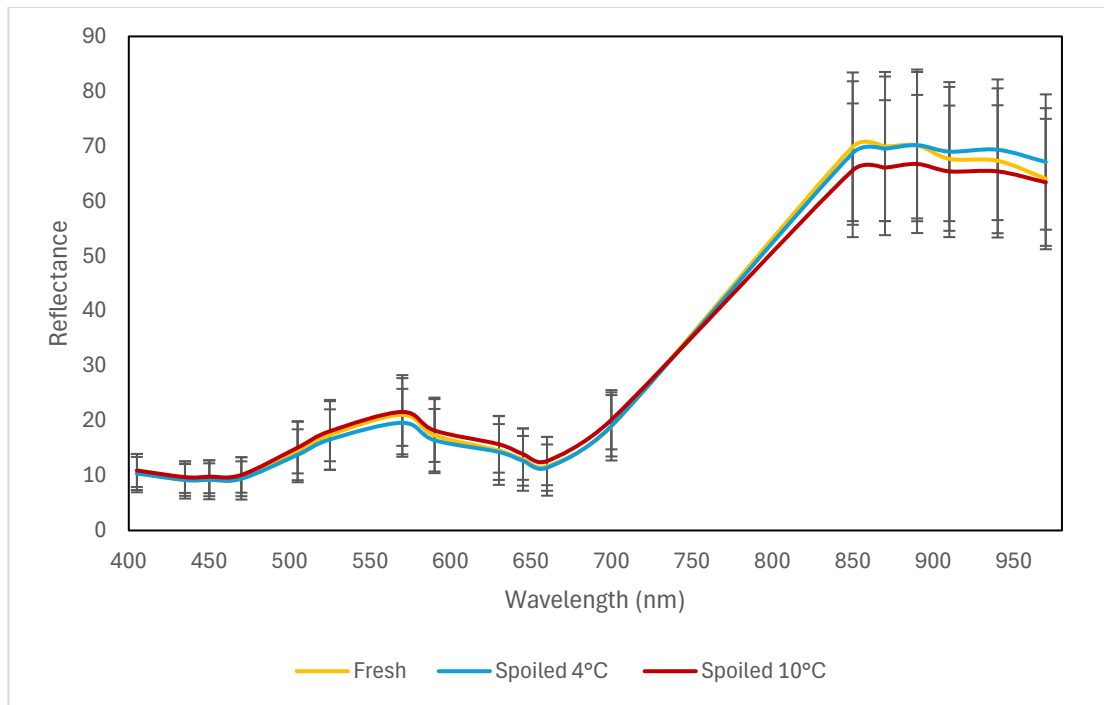
3.4 Αποτελέσματα φασματοσκοπικών δεδομένων

3.4.1 Αποτελέσματα από τα δεδομένα της πολυφασματικής απεικόνισης (MSI).

Για την συλλογή δεδομένων μέσω της πολυφασματικής απεικόνισης χρησιμοποιήθηκαν δύο τύπου συσκευές (VideometerLab, VideometerLite), όπως έχει προαναφερθεί. Τα αποτελέσματα των δύο συσκευών πολυφασματικής απεικόνισης μελετήθηκαν ξεχωριστά ως δύο διαφορετικές περιπτώσεις, ενώ σε κάθε περίπτωση τα δείγματα εξετάστηκαν συγκεντρωτικά για κάθε όργανο.

VideometerLab

Παρακάτω παρατίθεται το συγκριτικό διάγραμμα των δεδομένων μέσω πολυφασματικής απεικόνισης και συγκεκριμένα με την βοήθεια του οργάνου VideometerLab. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται τα δείγματα για όλες τις περιπτώσεις ως φρέσκα (δείγματα πρώτων ημερών δειγματοληψίας, <6.7 log cfu/g) και ως αλλοιωμένα στις δύο θερμοκρασίες συντήρησης (>7.7 log cfu/g).



Διάγραμμα 3.5 Συγκριτική απεικόνιση των φασματοσκοπικών δεδομένων VideometerLab και των τυπικών αποκλίσεων (\pm) για φρέσκα και αλλοιωμένα δείγματα στις δυο θερμοκρασίες συντήρησης

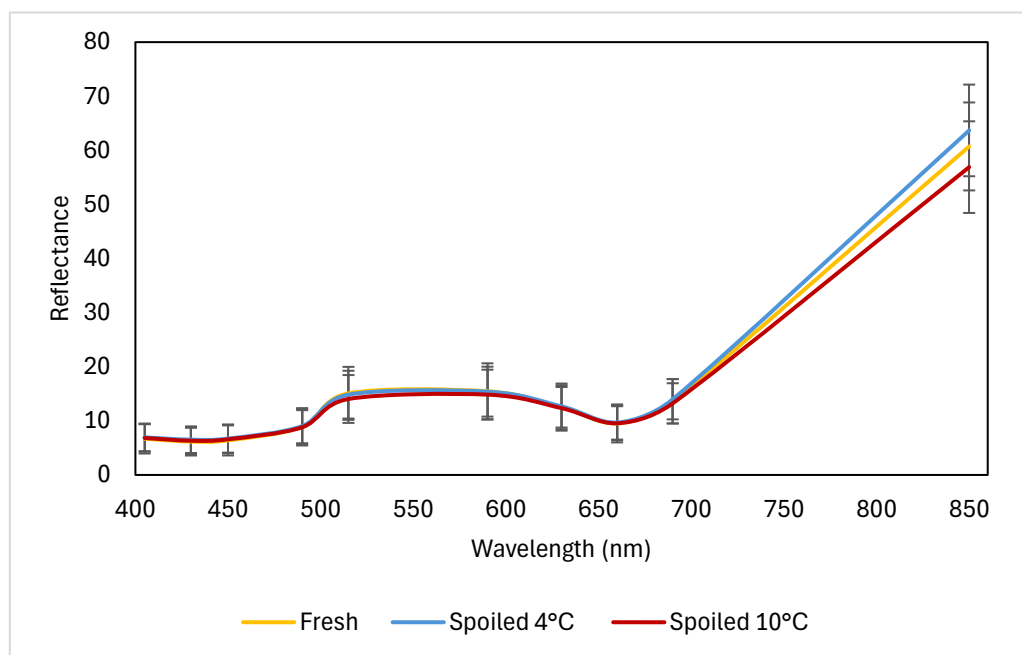
Από το Διάγραμμα 3.5 παρατηρείται ότι οι τρεις περιπτώσεις, στις οποίες έχουν ταξινομηθεί τα δείγματα, εμφανίζουν παρόμοια τάση και αντίστοιχη απορρόφηση στα μήκη κύματος.

Η μέγιστη απορρόφηση των δειγμάτων στα 18 μήκη κύματος παρουσιάζεται κοντά στη περιοχή του NIR, συγκεκριμένα περίπου από 850 έως 970 nm. Οι μελέτες που έχουν εφαρμόσει την μέθοδο της πολυφασματικής απεικόνισης σε φυλλώδη λαχανικά είναι ελάχιστες. Ωστόσο, από μελέτες που αφορούν άλλου είδους τρόφιμα αναφέρεται ότι στην περιοχή του NIR, η απορρόφηση στα 750, 940 και 970nm είναι άμεσα συνδεδεμένη με την περιεκτικότητα των δειγμάτων σε υγρασία (ElMasry et al., 2013; Panagou et al., 2014; Spyrelli et al., 2020). Ωστόσο, η κορυφή στα 550 nm είναι στην περιοχή του πράσινου φάσματος του ορατού φωτός, γεγονός που αποδεικνύει τον εντοπισμό της αλλοίωσης, όπως φαίνεται και με γυμνό μάτι.

VideometerLite

Αντίστοιχα, παρατίθενται διάγραμμα φρέσκων - αλλοιωμένων δειγμάτων για το φορητό όργανο VideometerLite, για τα 10 μήκη κύματος σε εύρος 405-850 nm. Ομοίως με το VideometerLab παρουσιάζονται τα φρέσκα δείγματα (δείγματα πρώτων ημερών

δειγματοληψίας, $<6.7 \log \text{ cfu/g}$) και τα αλλοιωμένα στις δύο θερμοκρασίες συντήρησης ($>7.7 \log \text{ cfu/g}$).



Διάγραμμα 3.6 Συγκριτική απεικόνιση των φασματοσκοπικών δεδομένων VideometerLite και των τυπικών αποκλίσεων (\pm) για φρέσκα και αλλοιωμένα δείγματα στις δύο θερμοκρασίες συντήρησης

Οι τρεις περιπτώσεις δειγμάτων δεν διαφοροποιούνται ως προς την απορρόφηση τους στα μήκη κύματος για το όργανο του VideometerLite. Ωστόσο, παρόμοια τάση εμφανίζεται στο σταθερό όργανο μέτρησης MSI (VideometerLab) και στο φορητό (VideometerLite), με αποτέλεσμα τα δύο όργανα να επιβεβαιώνονται μεταξύ τους.

Αναφορικά με το φορητό όργανο VideometerLite δεν υπάρχουν αντίστοιχες έρευνες και λαμβάνονται υπόψη οι έρευνες για το σταθερό όργανο μέτρησης MSI.

Επομένως, όπως και στο VideometerLab, η μέγιστη απορρόφηση που παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 3.6, σχετίζεται άμεσα με την περιεκτικότητα των δειγμάτων σε υγρασία (ElMasry et al., 2013; Panagou et al., 2014; Spyrelli et al., 2020). Ομοίως, στην περιοχή του πράσινου φάσματος του ορατού φωτός παρατηρείται μια καμπύλη, η οποία σχετίζεται άμεσα με το χρώμα του τροφίμου και κατ' επέκταση της αλλοίωσης του.

3.4.1.1 Αποτελέσματα από τα δεδομένα των PLS-R μοντέλων της πολυφασματικής απεικόνισης

Η αξιολόγηση του μοντέλου εκτίμησης του πληθυσμού OMX για την σαλάτα μαρουλιού μέσω δεδομένων πολυφασματικής απεικόνισης, απέδωσε τους δείκτες απόδοσης για την ανάπτυξη, την επικύρωση και την πρόβλεψη του μοντέλου, οι οποίοι παρατίθενται στον παρακάτω Πίνακα 3.4.

Οι συντελεστές συσχέτισης R^2 για το όργανο VideometerLab κυμαίνονται από 0.331 έως 0.466, ενώ για το RMSE από 0.347 έως 0.649. Αντίστοιχα τα RMSE μέσω του VideometerLab βρίσκονται σε ένα εύρος από 0.7 έως 0.72, ενώ για το VideometerLite από 0.451 έως 0.604.

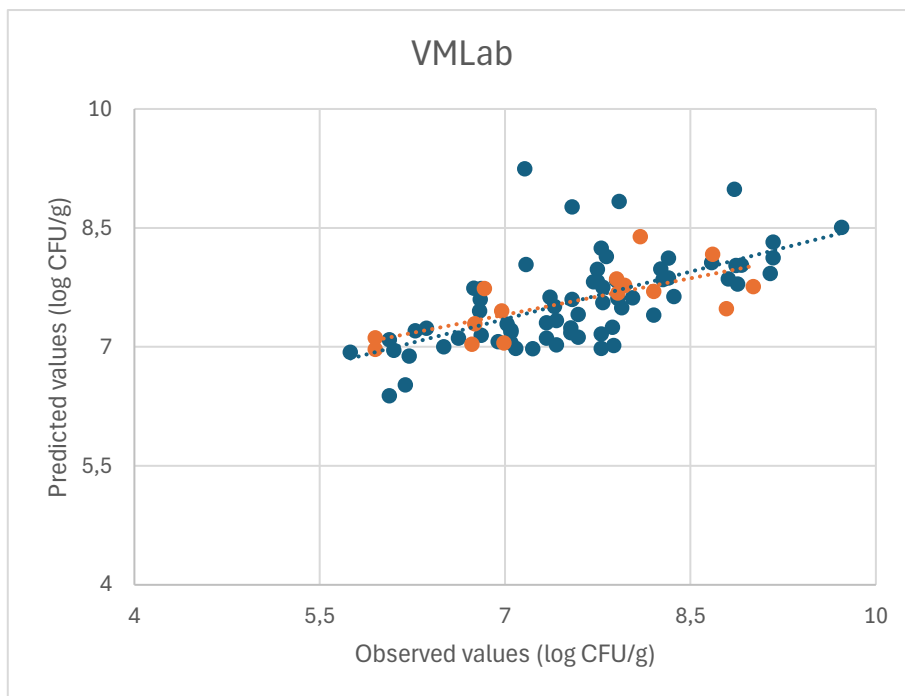
Σύμφωνα με τους (Manthou et al., 2022), ο ιδανικότερος συνδυασμός για την ανάπτυξη ενός ικανοποιητικού μοντέλου πρόβλεψης OMX είναι από τα δεδομένα της γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS-R) μέσω της πολυφασματικής απεικόνισης, συγκριτικά με το αντίστοιχο μοντέλο μέσω την φασματοσκοπίας υπερύθρου. Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως η μελέτη απέδωσε κλίση (slope), offset, R^2 και RMSE ίσα με 0.7, 2.1, 0.7, και 0.7 αντίστοιχα για την πρόβλεψη του μοντέλου (Manthou et al., 2020).

Στην παρούσα μελέτη, οι δείκτες απόδοσης δεν αντικατοπτρίζουν το ίδιο αποτέλεσμα. Μελετώντας και συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δύο οργάνων, φαίνεται ότι το VideometerLab δεν παρουσιάζει ικανοποιητική απόδοση καθώς δεν συσχετίζεται αρκετά με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα για την OMX, καθώς τα R^2 παρουσιάζουν χαμηλές τιμές, εν αντιθέσει με τα RMSE που είναι σε υψηλά επίπεδα τιμών. Ομοίως το φορητό VideometerLite εμφανίζει παρόμοια απόδοση. Πιο συγκεκριμένα, για την πρόβλεψη των μοντέλων μέσω VideometerLab, τα R^2 και RMSE ισούνται με 0.331 και 0.708 αντίστοιχα, ενώ για το VideometerLite τα R^2 και RMSE απέδωσαν τιμές ίσες με 0.347 και 0.604 αντίστοιχα.

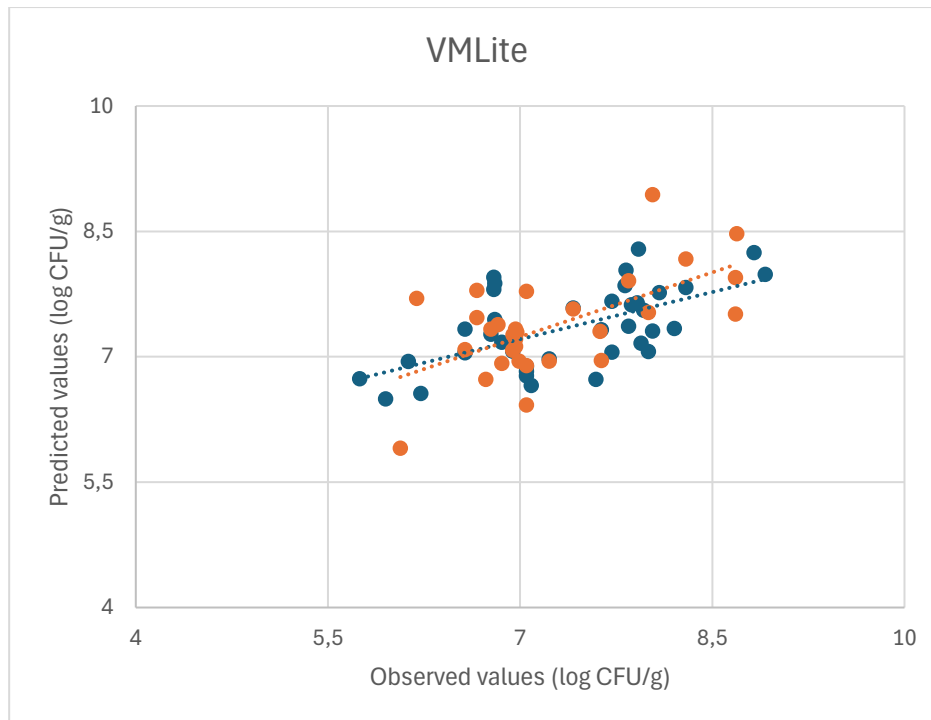
Τα Διαγράμματα 3.7 και 3.8 συσχετίζουν τις προβλεπόμενες και παρατηρούμενες τιμές. Οι αποκλίσεις που παρατηρούνται από την ιδανική γραμμή $y=x$ επιβεβαιώνουν την μη αναμενόμενη απόδοση των μοντέλων πρόβλεψης OMX μέσω πολυφασματικής απεικόνισης για την σαλάτα μαρουλιού.

Πίνακας 3.4 Αποτελέσματα των PLS-R μοντέλων που συσχετίζουν την OMX των δειγμάτων σαλάτας μαρουλιού με τα δεδομένα πολυφασματικής απεικόνισης

Όργανο	Δεδομένα	Slope	Offset	R ²	RMSE
VMLab	Ανάπτυξη (n=164)	0.466	4.082	0.466	0.702
	Επικύρωση CV	0.398	4.565	0.429	0.721
	Πρόβλεψη (n=78)	0.306	5.264	0.331	0.708
VMLite	Ανάπτυξη (n=61)	0.649	2.609	0.649	0.495
	Επικύρωση CV	0.514	3.641	0.289	0.451
	Πρόβλεψη (n=38)	0.376	4.581	0.347	0.604



Διάγραμμα 3.7 Σύγκριση προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών της OMX που εκτιμήθηκαν από τα PLS-R μοντέλα βάσει της πολυφασματικής απεικόνισης (VideometerLab) των δειγμάτων σαλάτας μαρουλιού για την ανάπτυξη (●) και την πρόβλεψη (●) τους



Διάγραμμα 3.8 Σύγκριση προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών της OMX που εκτιμήθηκαν από τα PLS-R μοντέλα βάσει της πολυφασματικής απεικόνισης (VideometerLite) των δειγμάτων σαλάτας μαρουλιού για την ανάπτυξη (●) και την πρόβλεψη (●) τους

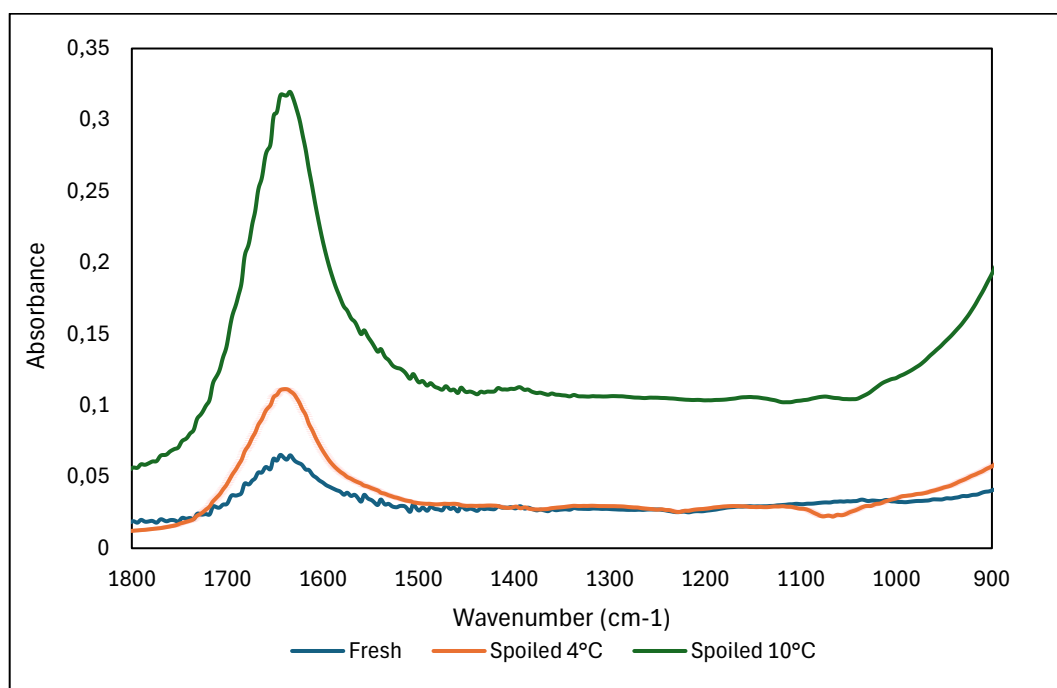
3.4.2 Αποτελέσματα από τα δεδομένα της φασματοσκοπίας υπεράυθρου (FTIR)

Οι βιοχημικές αλλαγές που υφίσταται ένα τρόφιμο κατά την αλλοίωσή του, μπορούν να προσδιοριστούν μέσω της συλλογής και χρήσης φασματοσκοπικών δεδομένων, τα οποία λειτουργούν σαν δακτυλικά αποτυπώματα (Papadopoulou et al., 2011). Τα φασματοσκοπικά δεδομένα που συλλέχθηκαν για όλες τις περιπτώσεις δειγμάτων μαρουλιού, μελετήθηκαν μεταξύ 1900 έως 870 cm^{-1} . Το συγκεκριμένο εύρος περιοχής επιλέχθηκε προς μελέτη, καθώς σύμφωνα με προηγούμενες εύρυνες εκεί εμφανίζονται κατά κύριο λόγο οι σημαντικές περιοχές για το είδος του τρόφιμου που μελετάται (Tsakanikas et al., 2018; Shah et al., 2019; Manthou et al., 2022).

Στο Διάγραμμα 3.9 παρουσιάζεται ένα συγκριτικό διάγραμμα μεταξύ φρέσκων και αλλοιωμένων δειγμάτων, ως φρέσκα χαρακτηρίστηκαν τα δείγματα της πρώτης μέρας της δειγματοληψίας τα οποία δεν είχαν υποστεί αλλοίωση, ενώ αλλοιωμένα χαρακτηρίστηκαν τα δείγματα των τελευταίων ημερών που είχαν απορριφθεί οργανοληπτικά.

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα, τα αλλοιωμένα δείγματα στους 10°C παρουσιάζουν μεγαλύτερη απορρόφηση συγκριτικά με τις άλλες περιπτώσεις, ενώ τα αλλοιωμένα

δείγματα των 4°C εμφανίζουν ελάχιστα μεγαλύτερη απορρόφηση σχετικά με τα φρέσκα δείγματα μαρουλιού.



Διάγραμμα 3.9 Συγκριτική απεικόνιση των φασματοσκοπικών δεδομένων FTIR για φρέσκα και αλλοιωμένα δείγματα στις δυο θερμοκρασίες συντήρησης

Πιο αναλυτικά, σε κάθε περίπτωση εμφανίζεται η σημαντικότερη και κύρια κορυφή περίπου στα 1634-1640 cm⁻¹, λόγω της παρουσίας πολυφαινολών, νερού και αντιοξειδωτικών (C=O stretch, C=C stretch, O=H bend) (Lu et al., 2011; Falcioni et al., 2022; Zhang et al., 2023). Παράλληλα, ο κυματάριθος 1640 cm⁻¹ συσχετίστηκε με τις δονητικές κινήσεις των ομάδων C=C στους αρωματικούς δακτυλίους (Schulz & Baranska, 2007). Ο κυματάριθος 1640 cm⁻¹, σύμφωνα με μελέτες, είναι άμεσα συσχετισμένος με το αμίδιο I της πρωτεΐνης (1650–1680 cm⁻¹ ζώνη αμιδίου I) (Movasaghi et al., 2008; Ellis et al., 2012).

Δευτερευούσης σημασίας, μικρές κορυφές παρατηρούνται σε εύρος από 1140-1109 cm⁻¹ και στις δύο περιπτώσεις αλλοιωμένων δειγμάτων. Σε αυτή την περιοχή, οι κυματάριθοι θα μπορούσαν να συσχετισθούν με διατάσεις C-O και C-C των υδατανθράκων, των πολυσακχαριτών ή των φλαβονοειδών (Sinanoglou et al., 2018), ενώ πιθανολογείται ότι μεταξύ 1200-1100 cm⁻¹ οι κορυφές οφείλονται σε σύμπλεγμα αμινοξέων και πρωτεϊνών (πχ. C=O stretch + N-H bend/C-N stretch) (Falcioni et al., 2022). Η μικρή κορυφή στα 1050

cm^{-1} σχετίζεται με τα υπολείμματα φωσφορικών αλάτων (Monasaghi et al., 2008), τα οποία λειτουργούν ως πηγή φωσφόρου για την ανάπτυξη αλλοιογόνων μικροοργανισμών.

Σε ένα γενικότερο πλαίσιο, στην περιοχή ενδιαφέροντος της συγκεκριμένης μελέτης ορισμένες περιοχές παρουσιάζουν αντίστοιχο βιολογικό ενδιαφέρον, όπως C=O, N-H και C-N από πρωτεΐνες και πεπτίδια ($1750\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$), C-O και C-O-C από πολυσακχαρίτες ($1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$) και δονήσεις P-O από νουκλεϊκά οξέα ($1245\text{-}1220$ και $1090\text{-}1085\text{ cm}^{-1}$) (Ellis et al., 2012).

3.4.2.1 Αποτελέσματα από τα δεδομένα των PLS-R μοντέλων της φασματοσκοπίας υπερύθρου

Για την εκτίμηση του πληθυσμού της OMX των σαλατών μαρουλιού δημιουργήθηκε μοντέλο, του οποίου οι δείκτες απόδοσης για την ανάπτυξη, την επικύρωση και την πρόβλεψη του παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 3.5.

Όπως προαναφέρθηκε, ο συνδυασμός FTIR και PLS-R δεν αποτελεί την βέλτιστη περίπτωση ανάπτυξης μοντέλου για την πρόβλεψη της OMX, αντίθετα με τα αποτελέσματα των δεδομένων PLS-R μοντέλων μέσω της πολυφασματικής απεικόνισης. Σε παρόμοια έρευνα που αφορούσε την ανάπτυξη μοντέλου πρόβλεψης OMX σε ρόκα, τα R^2 και RMSE κυμαίνονταν περίπου στα 0.4 και 0.8 αντίστοιχα για την πρόβλεψη του μοντέλου, με αποτέλεσμα η απόδοση από τα δεδομένα PLS-R μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου να χαρακτηρίζεται ως μη ικανοποιητική. Ταυτόχρονα στην ίδια έρευνα για το σπανάκι, τα αντίστοιχα μοντέλα πρόβλεψης παρουσίασαν ομοίως μη αξιόλογους δείκτες απόδοσης (R^2 και RMSE περίπου ίσα με 0.3) (Manthou et al., 2020).

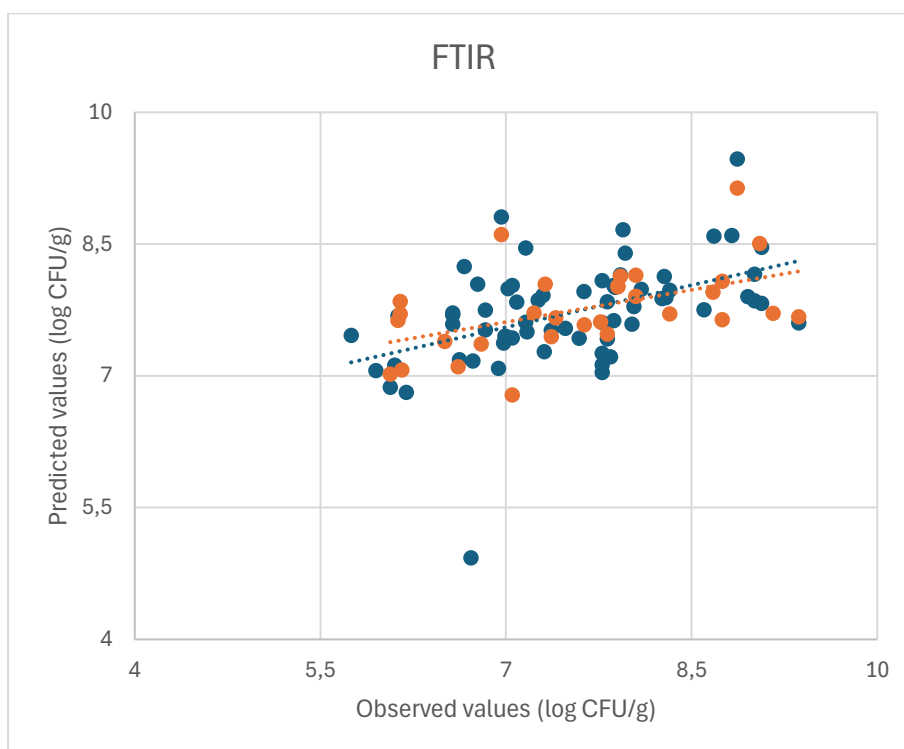
Αυτό επιβεβαιώνεται και στην παρούσα μελέτη από τα δεδομένα μέσω της φασματοσκοπίας υπερύθρου, τα οποία δεν είναι τα αναμενόμενα και δεν συσχετίζονται ικανοποιητικά με τα μικροβιολογικά αποτελέσματα για την OMX. Τα R^2 παρουσιάζουν ένα εύρος από 0.125 έως 0.396, ενώ τα RMSE από 0.737 έως 0.865, τα οποία σε συσχέτιση μεταξύ τους δεν αποδίδουν το ιδανικό αποτέλεσμα του μοντέλου. Συγκεκριμένα, για την πρόβλεψη του μοντέλου οι τιμές απόδοσης των R^2 και RMSE ανέρχονταν στα 0.125 και 0.847 αντίστοιχα.

Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα των προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών που απέδωσε το μοντέλο για την σαλάτα μαρουλιού (Διάγραμμα 3.10). Ομοίως με το μοντέλο πρόβλεψης μέσω πολυφασματικής απεικόνισης και στο Διάγραμμα 3.10

παρατηρούνται αποκλίσεις από την ιδανική γραμμή $y=x$, με αποτέλεσμα την επιβεβαίωση για την μη ικανοποιητική απόδοση των μοντέλων πρόβλεψης OMX σε κανένα όργανο και δείγμα.

Πίνακας 3.5 Αποτελέσματα των PLS-R μοντέλων που συσχετίζουν την OMX των δειγμάτων σαλάτας μαρουλιού με τα δεδομένα φασματοσκοπίας υπερύθρου

Όργανο	Δεδομένα	Slope	Offset	R ²	RMSE
FTIR	Ανάπτυξη (n=103)	0.362	4.905	0.226	0.865
	Επικύρωση CV	0.319	5.318	0.396	0.737
	Πρόβλεψη (n=57)	0.244	5.9016	0.125	0.847



Διάγραμμα 3.10 Σύγκριση προβλεπόμενων και παρατηρούμενων τιμών τους OMX που εκτιμήθηκαν από τα PLS-R μοντέλα βάσει τους φασματοσκοπίας υπερύθρου (FTIR) των δειγμάτων σαλάτας μαρουλιού για την ανάπτυξη (●) και την πρόβλεψη (●) τους

4. Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων της παρούσας μελέτης συμφωνούν με την διεθνή βιβλιογραφία, καθώς όχι μόνο επιβεβαιώνονται οι κύριοι αλλοιογόνοι πληθυσμοί του μαρουλιού, αλλά παρουσιάζεται η επίδραση της θερμοκρασίας αποθήκευσης και το είδος της συσκευασίας ως μέσα παράτασης του χρόνου ζωής του προϊόντος. Συγκεκριμένα, στις δύο περιπτώσεις εμβολιασμού των δειγμάτων οι πληθυσμοί που κυριάρχησαν κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας είναι το γένος *Pseudomonas* spp και η οικογένεια Enterobacteriaceae.

Οι δύο ανεξάρτητοι κύκλοι πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν, για εμβολιασμένα δέματα με *L. monocytogenes* και *E. coli*, δεν διαφοροποιήθηκαν στα αποτελέσματα των μικροβιολογικών αναλύσεων, αποδίδοντας παρόμοια τάση στην ανάπτυξη των εξεταζόμενων μικροοργανισμών και της OMX. Ομοίως, παρόμοια τάση απέδωσαν και οι περιπτώσεις ψεκασμού (control, free cells, supernatant) σε κάθε πείραμα, παρουσιάζοντας μικρές διαφοροποιήσεις, κυρίως ως προς τον ψεκασμό με την βιομάζα του *Lactiplantibacillus pentosus* FMCC B281 συγκριτικά με το δείγμα control.

Συγκεκριμένα, στους δύο κύκλους πειραμάτων ο εναρκτήριο πληθυσμός της OMX, για κάθε δείγμα, ήταν περίπου στα 6.5 log cfu/g, ενώ κατέληξε να αυξηθεί κατά 1-1.5 log cfu/g περίπου στο τέλος της δειγματοληψίας για κάθε θερμοκρασία (4°C, 10°C). Το γένος *Pseudomonas* spp και η οικογένεια Enterobacteriaceae ήταν οι κύριοι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί και στις δυο περιπτώσεις παθογόνων, όπως επιβεβαιώνεται και από την διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με τα φυλλώδη λαχανικά. Το γένος *Pseudomonas* spp κυριάρχησε σε κάθε περίπτωση και στα δύο πειράματα, αφού ξεκινώντας από τα 5.5 log cfu/g περίπου αυξήθηκε ο πληθυσμός του κατά 2 λογάριθμους περίπου στα δείγματα που συντηρήθηκαν στους 4°C. Στα εμβολιασμένα δείγματα με *L.monocytogenes*, ο πληθυσμός των ψευδομονάδων εκτοξεύθηκε στο τέλος της δειγματοληψίας για τους 10°C, καθώς στο control δείγμα σημειώθηκαν 9.04 ± 0.43 log cfu/g, ενώ λιγότερη αύξηση καταγράφηκε για τις περιπτώσεις βιομάζας και supernatant (7.65 ± 0.19 log cfu/g και 8.11 ± 0.04 log cfu/g αντίστοιχα). Ο εναρκτήριο πληθυσμός τη οικογένειας Enterobacteriaceae στα εμβολιασμένα δείγματα με *L. monocytogenes* ήταν περίπου στα 5 log cfu/g σε κάθε περίπτωση, στους 4°C δεν υπήρξε κάποια αξιοσημείωτη παρατήρηση, ενώ στους 10°C η περίπτωση του control υπερέβη τις φυσιολογικές τιμές βάσει της διεθνούς βιβλιογραφίας (7.87 ± 0.04 log cfu/g), γεγονός που δεν παρατηρήθηκε στις περιπτώσεις παρουσία βιο-

προστασίας. Στην περίπτωση των εμβολιασμένων δειγμάτων με *E.coli*, σημειώθηκε ραγδαία αύξηση του πληθυσμού των εντεροβακτηρίων από την αρχή έως το τέλος της δειγματοληψίας σε κάθε περίπτωση ψεκασμού και θερμοκρασίας (αύξηση κατά 3 log cfu/g). Αυτό δικαιολογείται λόγω της παρουσίας *E.coli* μέσω του ψεκασμού, το οποίο ανήκει στην οικογένεια Enterobacteriaceae. Οι ζύμες και οι μύκητες σε κάθε περίπτωση διατηρήθηκαν σε φυσιολογικά επίπεδα, σύμφωνα με την βιβλιογραφία. Η παρουσία των γαλακτικών βακτηρίων ήταν έντονη κυρίως στις περιπτώσεις ψεκασμού βιομάζας και υπερκειμένου, σημειώνοντας υψηλά επίπεδα πληθυσμού και στις δύο περιπτώσεις παθογόνων. Χαρακτηριστικά στην περίπτωση εμβολιασμού με *E.coli*, το δείγμα που είχε ψεκαστεί με τα ελεύθερα κύτταρα του *L. pentosus* FMCC B281 σημείωσε αύξηση 2-3 log cfu/g στο τέλος της δειγματοληψίας και στις δύο θερμοκρασίες συντήρησης. Σύμφωνα με μελέτες το γαλακτικό βακτήριο *L. pentosus* FMCC B281, παρέχει ευεργετικές ιδιότητες στον ξενιστή, γεγονός που αποδίδει προβιοτικό χαρακτήρα in vitro (Saxami et al., 2017).

Όσον αφορά τους πληθυσμούς των δύο παθογόνων με τους οποίους εμβολιάστηκαν τα δείγματα στους δύο κύκλους πειραμάτων, η *L. monocytogenes* παρουσίασε σταθερή τάση χωρίς διακυμάνσεις και αξιοσημείωτες διαφορές στις διάφορες περιπτώσεις και θερμοκρασίες, ομοίως και το *E. coli*. Η *L. monocytogenes* είναι ένας ψυχρότροφος μικροοργανισμός ανθεκτικός σε χαμηλές θερμοκρασίες, ωστόσο η μη αποτελεσματικότητα της βιο-προστασίας και στους 10°C αποδεικνύει πως το *L. pentosus* FMCC B281 δεν λειτούργησε ως παρεμποδιστικός παράγοντας στην ανάπτυξη της *L. monocytogenes*. Ομοίως, για το *E.coli*, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στην ανάπτυξη του κατά την διάρκεια της δειγματοληψίας. Αυτό δικαιολογείται σύμφωνα με την βιβλιογραφία, λόγω της Gram αρνητικής φύσης του βακτηρίου η οποία λόγω της εξωτερικής μεμβράνης προσδίδει ανθεκτικότητα και προστασία έναντι αντιμικροβιακών παραγόντων. Η παρατήρηση αυτή ισχύει για κάθε Gram αρνητικό μικροοργανισμό, όπως το γένος *Pseudomonas* spp. Ωστόσο, στην ανάπτυξη των *Pseudomonas* spp. και Enterobacteriaceae φάνηκε να συμβάλει η βιο-προστασία, όσον αφορά τα ψεκασμένα δείγματα με βιομάζα και υπερκείμενο, συγκριτικά με αυτά του control στην θερμοκρασία συντήρησης των 10°C.

Το pH δεν παρουσίασε διακυμάνσεις, παρέμεινε σταθερό και εντός των φυσιολογικών τιμών σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία, καθ' όλη την διάρκεια τις δειγματοληψίας για κάθε περίπτωση δείγματος μαρουλιού. Στην οργανοληπτική αξιολόγηση, αξιοσημείωτη παρατήρηση είναι ότι η παρουσία του *L.pentosus* FMCC-B281 συνέβαλε θετικά στην

διατήρηση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων. Αναλυτικά, τα δείγματα που εμπεριείχαν βιο-προστασία εμφάνισαν βελτιωμένη εμφάνιση, με πιο τραγανά φύλλα μαρουλιού συγκριτικά με το δείγμα control το οποίο είχε την αναμενόμενη μάρανση.

Τα μοντέλα πρόβλεψης OMX για τα δείγματα μαρουλιού δεν μπορούν να θεωρηθούν ικανοποιητικά, καθώς δεν απέδωσαν τους αναμενόμενους δείκτες τιμών. Συγκεκριμένα, η τιμή του RMSE για την πρόβλεψη είναι ίση με 0.708 για το VideometerLab και 0.604 για το VideometerLite. Η τιμή του R^2 είναι ίση με 0.331 και 0.347 αντίστοιχα για τα δύο παραπάνω όργανα. Τα μήκη κύματος που επηρεάζουν την επίδοση του μοντέλου σχετίζονται άμεσα με την υγρασία των δειγμάτων. Για το FTIR, οι αντίστοιχες τιμές για την πρόβλεψη του μοντέλου, η τιμή του RMSE ισούται με 0.847 και του R^2 με 0.125. Επομένως, διαπιστώνεται πως τα μοντέλα πρόβλεψης της OMX δεν είχαν την αναμενόμενη επίδοση. Πιθανόν αυτό να οφείλεται στην φύση του τροφίμου, λόγω των φύλλων μαρουλιού που δεν μπορούν να εφαρμόσουν απόλυτα στον κρύσταλλο ZnSe 45° HATR για την λήψη δεδομένων μέσω FTIR, αλλά και στο MSI δημιουργούν πτυχώσεις και σκιάσεις κατά την λήψη εικόνων. Επιπλέον, πιθανολογείται πως η διαφοροποίηση μικροβιολογικών αποτελεσμάτων από αυτά τις οργανοληπτικής αξιολόγησης, επηρέασαν την απόδοση του μοντέλου.

Συμπερασματικά, η διάρκεια ζωής των σαλατών μαρουλιού παρατάθηκε χάρη στην συσκευασία τροποποιημένης ατμόσφαιρας, όπως έχει αποδειχθεί, ενώ συνέβαλε σημαντικά και η χαμηλή θερμοκρασία συντήρησης. Ο ψεκασμός των δειγμάτων, είτε με ελεύθερα κύτταρα, είτε με το υπερκείμενο του *L. pentosus* FMCC B281 δεν είχε τα αναμενόμενα αποτελέσματα, ως βιο-προστασία έναντι της ανάπτυξης των δύο παθογόνων. Ωστόσο, παρουσιάστηκε αρκετά βελτιωμένη εμφάνιση των σαλατών με παρουσία γαλακτικών βακτηρίων, παρατείνοντας τον χρόνο ζωής των δειγμάτων. Επομένως, η βιοσυντήρηση δεν συνέβαλε στην μειωμένη ανάπτυξη των παθογόνων, ούτε υποβάθμισε την ασφάλεια του προϊόντος, αλλά συνέβαλε εμφανώς στην όψη και την ποιότητα των σαλατών μαρουλιού. Τέλος, τα μοντέλα προσβλέψεις της OMX δεν είχαν ικανοποιητική απόδοση. Πρόταση για βελτίωση των μοντέλων πρόβλεψης σε δείγματα μαρουλιού, σε μελλοντικές μελέτες, θα μπορούσε να είναι αύξηση των δειγμάτων ή μια εντελώς διαφορετική προσέγγιση που να εστιάζει στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και όχι στην πρόβλεψη της OMX.

5. Βιβλιογραφία

- Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., Sachadyn-Król, M., & Varzakas, T. (2020). Lactic Acid Bacteria as Antibacterial Agents to Extend the Shelf Life of Fresh and Minimally Processed Fruits and Vegetables: Quality and Safety Aspects. *Microorganisms* 2020, Vol. 8, Page 952, 8(6), 952. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8060952>
- Ahmad, A., & Ayub, H. (2022). Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) Technique for Food Analysis and Authentication. *Nondestructive Quality Assessment Techniques for Fresh Fruits and Vegetables*, 103–142. https://doi.org/10.1007/978-981-19-5422-1_6/COVER
- Allende, A., Martínez, B., Selma, V., Gil, M. I., Suárez, J. E., & Rodríguez, A. (2007). Growth and bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes* in vitro and in fresh-cut lettuce. *Food Microbiology*, 24(7–8), 759–766. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2007.03.002>
- Arienzo, A., Murgia, L., Fraudentali, I., Gallo, V., Angelini, R., & Antonini, G. (2020). Microbiological Quality of Ready-to-Eat Leafy Green Salads during Shelf-Life and Home-Refrigeration. *Foods* 2020, Vol. 9, Page 1421, 9(10), 1421. <https://doi.org/10.3390/FOODS9101421>
- Balali, G. I., Yar, D. D., Afua Dela, V. G., & Adjei-Kusi, P. (2020). Microbial Contamination, an Increasing Threat to the Consumption of Fresh Fruits and Vegetables in Today's World. *International Journal of Microbiology*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/3029295>
- Barcenilla, C., Puente, A., Cobo-Díaz, J. F., Alexa, E. A., Garcia-Gutierrez, E., O'Connor, P. M., Cotter, P. D., González-Raurich, M., López, M., Prieto, M., & Álvarez-Ordóñez, A. (2023). Selection of lactic acid bacteria as biopreservation agents and optimization of their mode of application for the control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat cooked meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 403, 110341. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2023.110341>
- Basalekou, M., Kallithraka, S., Tarantilis, P. A., Kotseridis, Y., & Pappas, C. (2019). Ellagitannins in wines: Future prospects in methods of analysis using FT-IR spectroscopy. *LWT*, 101, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.017>
- Bhunja, A. K. (2019). *FOODBORNE MICROBIAL PATHOGENS: mechanisms and pathogenesis*. (2nd ed.). SPRINGER-VERLAG NEW YORK.
- Boelaert, F., Stoicescu, A., Amore, G., Messens, W., Hempen, M., Rizzi, V., Antoniou, S. E., Baldinelli, F., Dorbek-Kolin, E., Van der Stede, Y., Niskanen, T., Haussig, J., Kaczmarek, M., Dias, J. G., Barco, L., Mancin, M., Mantovani, C., Sardella, A., Antonelli, P., ... Altieri, I. (2021). The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 19(2), e06406. <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2021.6406>
- Borges, F., Briandet, R., Callon, C., Champomier-Vergès, M. C., Christieans, S., Chuzeville, S., Denis, C., Desmasures, N., Desmonts, M. H., Feurer, C., Leroi, F., Leroy, S., Mounier, J., Passerini, D., Pilet, M. F., Schlusshuber, M., Stahl, V., Strub, C., Talon, R., & Zagorec, M. (2022). Contribution of omics to biopreservation:

- Toward food microbiome engineering. *Frontiers in Microbiology*, 13, 951182. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2022.951182/BIBTEX>
- Carrasco, E., Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., García-Gimeno, R. M., & Zurera, G. (2010). Risk Assessment and Management of *Listeria Monocytogenes* in Ready-to-Eat Lettuce Salads. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(5), 498–512. <https://doi.org/10.1111/J.1541-4337.2010.00123.X>
- D'Agostino, M., & Cook, N. (2016). Foodborne Pathogens. In *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 83–86). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00326-3>
- Denkova, R., Goranov, B., Teneva, D., Denkova, Z., & Kostov, G. (2017). *Antimicrobial activity of probiotic microorganisms : mechanisms of interaction and methods of examination*.
- Dissing, B. S., Papadopoulou, O. S., Tassou, C., Ersbøll, B. K., Carstensen, J. M., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. (2013). Using Multispectral Imaging for Spoilage Detection of Pork Meat. *Food and Bioprocess Technology*, 6(9), 2268–2279. <https://doi.org/10.1007/S11947-012-0886-6/METRICS>
- Dong, Q., Zhang, W., Guo, L., Niu, H., Liu, Q., & Wang, X. (2020). Influence of *Lactobacillus plantarum* individually and in combination with low O2-MAP on the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes* in cabbage. *Food Control*, 107, 106765. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2019.106765>
- Doulgeraki, A. I., Pramateftaki, P., Argyri, A. A., Nychas, G. J. E., Tassou, C. C., & Panagou, E. Z. (2013). Molecular characterization of lactic acid bacteria isolated from industrially fermented Greek table olives. *LWT - Food Science and Technology*, 50(1), 353–356. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2012.07.003>
- Dutta, A. (2017). Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization*, 2, 73–93. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46140-5.00004-2>
- EFSA. (2011). Urgent advice on the public health risk of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* in fresh vegetables. *EFSA Journal*, 9(6), 2274. <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2011.2274>
- Ellis, D. I., Brewster, V. L., Dunn, W. B., Allwood, J. W., Golovanov, A. P., & Goodacre, R. (2012). Fingerprinting food: current technologies for the detection of food adulteration and contamination. *Chemical Society Reviews*, 41(17), 5706–5727. <https://doi.org/10.1039/C2CS35138B>
- ElMasry, G., Sun, D. W., & Allen, P. (2013). Chemical-free assessment and mapping of major constituents in beef using hyperspectral imaging. *Journal of Food Engineering*, 117(2), 235–246. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2013.02.016>
- Erkmen, O., & Bozoglu, T. F. (2016). Spoilage of Vegetables and Fruits. In *Food Microbiology: Principles into Practice* (Vol. 1, pp. 1–458). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119237860>

- Esposito Vinzi, V., Chin, W. W., Henseler, J., & Wang, H. (2010). *Handbook of Partial Least Squares: Concepts, Methods and Applications (Springer Handbooks of Computational Statistics)* (S. H. of C. Statistics, Ed.; 1st ed.). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-32827-8>
- Estrada-Garcia, T., & Tarr, P. I. (2023). Escherichia coli Infection. *Foodborne Infections and Intoxications*, 125–163. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819519-2.00018-9>
- Falcioni, R., Moriwaki, T., Gibin, M. S., Vollmann, A., Pattaro, M. C., Giacomelli, M. E., Sato, F., Nanni, M. R., & Antunes, W. C. (2022). Classification and Prediction by Pigment Content in Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Varieties Using Machine Learning and ATR-FTIR Spectroscopy. *Plants*, 11(24). <https://doi.org/10.3390/plants11243413>
- FAO. (2022). *FAOSTAT*. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>
- FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization]. (2008). *Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs: Meeting Report. Microbiological Risk Assessment Series No. 14*. 151pp. https://books.google.com/books/about/Microbiological_Hazards_in_Fresh_Leafy_Vegetables_and_Herbs.html?hl=en&id=jyeMrPdPKy8C
- Federico, B., Pinto, L., Quintieri, L., Carito, A., Calabrese, N., & Caputo, L. (2015). Efficacy of lactoferricin B in controlling ready-to-eat vegetable spoilage caused by *Pseudomonas* spp. *International Journal of Food Microbiology*, 215, 179–186. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2015.09.017>
- Feng, C. H., Makino, Y., Oshita, S., & García Martín, J. F. (2018). Hyperspectral imaging and multispectral imaging as the novel techniques for detecting defects in raw and processed meat products: Current state-of-the-art research advances. *Food Control*, 84, 165–176. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2017.07.013>
- Fengou, L. C., Lianou, A., Tsakanikas, P., Gkana, E. N., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. E. (2019). Evaluation of Fourier transform infrared spectroscopy and multispectral imaging as means of estimating the microbiological spoilage of farmed sea bream. *Food Microbiology*, 79, 27–34. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2018.10.020>
- Fijan, S. (2016). Antimicrobial Effect of Probiotics against Common Pathogens. *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*. <https://doi.org/10.5772/63141>
- Francis, G. A., Gallone, A., Nychas, G. J., Sofos, J. N., Colelli, G., Amodio, M. L., & Spano, G. (2012). Factors Affecting Quality and Safety of Fresh-Cut Produce. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(7), 595–610. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.503685>
- Franzetti, L., & Scarpeluni, M. (2007). Characterisation of *Pseudomonas* spp. isolated from foods. *Annals of Microbiology*, 57(1), 39–47. <https://doi.org/10.1007/BF03175048/METRICS>
- Fröder, H., Martins, C. G., De Souza, K. L. O., Landgraf, M., Franco, B. D. G. M., & Destro, M. T. (2007). Minimally Processed Vegetable Salads: Microbial Quality Evaluation. *Journal of Food Protection*, 70(5), 1277–1280. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.5.1277>

- Garba, M., Dandago, M. A., Igwe, E. C., & Salami, K. D. (2022). A review on microbiological safety of Ready-To-Eat Salads. *Dutse Journal of Pure and Applied Sciences*, 7(4a), 38–48. <https://doi.org/10.4314/DUJOPAS.V7I4A.4>
- Govari, M., Tryfinopoulou, P., Parlapani, F. F., Boziaris, I. S., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. E. (2021). Quest of intelligent research tools for rapid evaluation of fish quality: FTIR spectroscopy and multispectral imaging versus microbiological analysis. *Foods*, 10(2), 264. <https://doi.org/10.3390/foods10020264>
- Gupta, D., & Madramootoo, C. A. (2017). Escherichia coli Contamination on Ready-To-Eat (RTE), Lettuce. *Exposure and Health*, 9(4), 249–259. <https://doi.org/10.1007/S12403-016-0236-4/METRICS>
- Hassan, M. N., Mekkawy, S. A., Mahdy, M., Salem, K. F. M., & Tawfik, E. (2021). Recent molecular and breeding strategies in lettuce (*Lactuca* spp.). In *Genetic Resources and Crop Evolution* (Vol. 68, Issue 8, pp. 3055–3079). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s10722-021-01246-w>
- Junnarkar, M., Pawar, S., Gaikwad, S., Mandal, A., Jass, J., & Nawani, N. (2019). Probiotic potential of lactic acid bacteria from fresh vegetables: Application in food preservation. *Indian Journal of Experimental Biology*, 57, 825–838. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>
- Kamarinou, C. S., Papadopoulou, O. S., Doulgeraki, A. I., Tassou, C. C., Galanis, A., Chorianopoulos, N. G., & Argyri, A. A. (2022). Mapping the Key Technological and Functional Characteristics of Indigenous Lactic Acid Bacteria Isolated from Greek Traditional Dairy Products. *Microorganisms*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10020246/S1>
- Kapetanakou, A. E., Taoukis, P., & Skandamis, P. N. (2019). Model development for microbial spoilage of packaged fresh-cut salad products using temperature and in-package CO₂ levels as predictor variables. *LWT*, 113. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108285>
- Kowalska, B., & Szczech, M. (2022). Differences in microbiological quality of leafy green vegetables. *Ann Agric Environ Med*, 29(2), 238–245. <https://doi.org/10.26444/aaem/149963>
- Łepecka, A., Zielińska, D., Szymański, P., Buras, I., & Kołożyn-Krajewska, D. (2022). Assessment of the Microbiological Quality of Ready-to-Eat Salads—Are There Any Reasons for Concern about Public Health? *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(3). <https://doi.org/10.3390/ijerph19031582>
- Lianou, A., Malavazos, C., Triantafyllou, I., Nychas, G. J. E., & Panagou, E. Z. (2018). Rapid assessment of the microbiological quality of pasteurized vanilla cream by means of Fourier transform infrared spectroscopy in tandem with support vector machine analysis. *Food Analytical Methods*, 11(3), 840–847. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-1063-3>

- Lim, J. Y., Yoon, J. W., & Hovde, C. J. (2010). A Brief Overview of Escherichia coli O157:H7 and Its Plasmid O157. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(1), 5. <https://doi.org/10.4014/jmb.0908.08007>
- Lopez-Velasco, G., Welbaum, G. E., Boyer, R. R., Mane, S. P., & Ponder, M. A. (2011). Changes in spinach phylloepiphytic bacteria communities following minimal processing and refrigerated storage described using pyrosequencing of 16S rRNA amplicons. *Journal of Applied Microbiology*, 110(5), 1203–1214. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2011.04969.X>
- Lu, X., Ross, C. F., Powers, J. R., Aston, D. E., & Rasco, B. A. (2011). Determination of Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Garlic (*Allium sativum*) and Elephant Garlic (*Allium ampeloprasum*) by Attenuated Total Reflectance–Fourier Transformed Infrared Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), 5215–5221. <https://doi.org/10.1021/JF201254F>
- Manios, S. G., Konstantinidis, N., Gounadaki, A. S., & Skandamis, P. N. (2013). Dynamics of low (1-4 cells) vs high populations of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium in fresh-cut salads and their sterile liquid or solidified extracts. *Food Control*, 29(2), 318–327. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.04.023>
- Manthou, E., Karnavas, A., Fengou, L. C., Bakali, A., Lianou, A., Tsakanikas, P., & Nychas, G. J. E. (2022). Spectroscopy and imaging technologies coupled with machine learning for the assessment of the microbiological spoilage associated to ready-to-eat leafy vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, 361. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109458>
- Manthou, E., Lago, S. L., Dargres, E., Lianou, A., Tsakanikas, P., Panagou, E. Z., Anastasiadi, M., Mohareb, F., & Nychas, G. J. E. (2020). Application of spectroscopic and multispectral imaging technologies on the assessment of ready-to-eat pineapple quality: A performance evaluation study of machine learning models generated from two commercial data analytics tools. *Computers and Electronics in Agriculture*, 175, 105529. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2020.105529>
- Mou, B. (2008). Lettuce. *Vegetables I*, 75–116. https://doi.org/10.1007/978-0-387-30443-4_3
- Movasaghi, Z., Rehman, S., & Rehman, I. U. (2008). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43(2), 134–179. <https://doi.org/10.1080/05704920701829043>
- Mozzi, F. (2016). Lactic Acid Bacteria. *Encyclopedia of Food and Health*, 501–508. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00414-1>
- Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z., & Mohareb, F. (2016). Novel approaches for food safety management and communication. *Current Opinion in Food Science*, 12, 13–20. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2016.06.005>
- Oliveira, M., Usall, J., Viñas, I., Anguera, M., Gatiús, F., & Abadias, M. (2010). Microbiological quality of fresh lettuce from organic and conventional production. *Food Microbiology*, 27(5), 679–684. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2010.03.008>

- Osaili, T. M., Alaboudi, A. R., Al-Quran, H. N., & Al-Nabulsi, A. A. (2018). Decontamination and survival of Enterobacteriaceae on shredded iceberg lettuce during storage. *Food Microbiology*, *73*, 129–136. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2018.01.022>
- Pampoukis, G., Lytou, A. E., Argyri, A. A., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. E. (2022). Recent Advances and Applications of Rapid Microbial Assessment from a Food Safety Perspective. In *Sensors* (Vol. 22, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/s22072800>
- Panagou, E. Z., Papadopoulou, O., Carstensen, J. M., & Nychas, G. J. E. (2014). Potential of multispectral imaging technology for rapid and non-destructive determination of the microbiological quality of beef filets during aerobic storage. *International Journal of Food Microbiology*, *174*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2013.12.026>
- Pang, H., Lambertini, E., Buchanan, R. L., Schaffner, D. W., & Pradhan, A. K. (2017). Quantitative microbial risk assessment for Escherichia coli O157:H7 in fresh-cut lettuce. *Journal of Food Protection*, *80*(2), 302–311. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-246>
- Papadopoulou, O., Panagou, E. Z., Tassou, C. C., & Nychas, G. J. E. (2011). Contribution of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy data on the quantitative determination of minced pork meat spoilage. *Food Research International*, *44*(10), 3264–3271. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.012>
- Papadopoulou, O. S., Argyri, A. A., Varzakis, E. E., Tassou, C. C., & Chorianopoulos, N. G. (2018). Greek functional Feta cheese: Enhancing quality and safety using a Lactobacillus plantarum strain with probiotic potential. *Food Microbiology*, *74*, 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.005>
- Pavli, F., Argyri, A., & Papadopoulou, O. S. (2016). Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria from Traditional Fermented Dairy and Meat Products: Assessment by In Vitro Tests and Molecular Characterization. *Journal of Probiotics & Health*, *04*(03). <https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000157>
- Pothakos, V., Samapundo, S., & Devlieghere, F. (2012). Total mesophilic counts underestimate in many cases the contamination levels of psychrotrophic lactic acid bacteria (LAB) in chilled-stored food products at the end of their shelf-life. *Food Microbiology*, *32*(2), 437–443. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2012.07.011>
- Qi, W., Tian, Y., Lu, D., & Chen, B. (2022). Research Progress of Applying Infrared Spectroscopy Technology for Detection of Toxic and Harmful Substances in Food. *Foods 2022, Vol. 11, Page 930, 11*(7), 930. <https://doi.org/10.3390/FOODS11070930>
- Qin, J., Chao, K., Kim, M. S., Lu, R., & Burks, T. F. (2013). Hyperspectral and multispectral imaging for evaluating food safety and quality. *Journal of Food Engineering*, *118*(2), 157–171. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2013.04.001>
- Ragaert, P., Devlieghere, F., & Debevere, J. (2007). Role of microbiological and physiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables.

- Ramos, B., Brandão, T. R. S., Teixeira, P., & Silva, C. L. M. (2020). Biopreservation approaches to reduce *Listeria monocytogenes* in fresh vegetables. *Food Microbiology*, 85, 103282. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2019.103282>
- Revelou, P. K., Pappa, C., Kakouri, E., Kanakis, C. D., Papadopoulos, G. K., Pappas, C. S., & Tarantilis, P. A. (2021). Discrimination of botanical origin of olive oil from selected Greek cultivars by SPME-GC-MS and ATR-FTIR spectroscopy combined with chemometrics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(7), 2994–3002. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10932>
- Rogalla, D., & Bomar, P. A. (2023). *Listeria Monocytogenes*. *Laboratory Models for Foodborne Infections*, 185–196. <https://doi.org/10.1201/9781315120089-11>
- Ropodi, A. I., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. E. (2016). Data mining derived from food analyses using non-invasive/non-destructive analytical techniques; determination of food authenticity, quality & safety in tandem with computer science disciplines. *Trends in Food Science & Technology*, 50, 11–25. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2016.01.011>
- Rosipal, R., & Krämer, N. (2006). Overview and Recent Advances in Partial Least Squares. *Lecture Notes in Computer Science (Including Subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*, 3940 LNCS, 34–51. https://doi.org/10.1007/11752790_2
- Ruiz-Roldán, L., Rojo-Bezares, B., Lozano, C., López, M., Chichón, G., Torres, C., & Sáenz, Y. (2021). Occurrence of *Pseudomonas* spp. in raw vegetables: Molecular and phenotypical analysis of their antimicrobial resistance and virulence-related traits. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12626. <https://doi.org/10.3390/IJMS222312626/S1>
- Santos, M. I., Grácio, M., Silva, M. C., Pedroso, L., & Lima, A. (2023). One Health Perspectives on Food Safety in Minimally Processed Vegetables and Fruits: From Farm to Fork. *Microorganisms* 2023, Vol. 11, Page 2990, 11(12), 2990. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11122990>
- Santos, T. S., Campos, F. B., Padovani, N. F. A., Dias, M., Mendes, M. A., & Maffei, D. F. (2020). Assessment of the microbiological quality and safety of minimally processed vegetables sold in Piracicaba, SP, Brazil. *Letters in Applied Microbiology*, 71(2), 187–194. <https://doi.org/10.1111/LAM.13305>
- Saxami, G., Karapetsas, A., Chondrou, P., Vasiliadis, S., Lamprianidou, E., Kotsianidis, I., Ypsilantis, P., Botaitis, S., Simopoulos, C., & Galanis, A. (2017). Potentially probiotic *Lactobacillus* strains with anti-proliferative activity induce cytokine/chemokine production and neutrophil recruitment in mice. *Beneficial Microbes*, 8(4), 615–623. <https://doi.org/10.3920/BM2016.0202>

- Schulz, H., & Baranska, M. (2007). Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, 43(1), 13–25. <https://doi.org/10.1016/J.VIBSPEC.2006.06.001>
- Shah, U., Ranieri, P., Zhou, Y., Schauer, C. L., Miller, V., Fridman, G., & Sekhon, J. K. (2019). Effects of cold plasma treatments on spot-inoculated *Escherichia coli* O157:H7 and quality of baby kale (*Brassica oleracea*) leaves. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 57, 102104. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.12.010>
- Shi, M., Gu, J., Wu, H., Rauf, A., Emran, T. Bin, Khan, Z., Mitra, S., Aljohani, A. S. M., Alhumaydhi, F. A., Al-Awthan, Y. S., Bahattab, O., Thiruvengadam, M., & Suleria, H. A. R. (2022). Phytochemicals, Nutrition, Metabolism, Bioavailability, and Health Benefits in Lettuce—A Comprehensive Review. *Antioxidants*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/antiox11061158>
- Shrestha, S., Deleuran, L. C., Olesen, M. H., & Gislum, R. (2015). Use of Multispectral Imaging in Varietal Identification of Tomato. *Sensors 2015, Vol. 15, Pages 4496-4512*, 15(2), 4496–4512. <https://doi.org/10.3390/S150204496>
- Sinanoglou, V. J., Zoumpoulakis, P., Fotakis, C., Kalogeropoulos, N., Sakellari, A., Karavoltsos, S., & Strati, I. F. (2018). On the Characterization and Correlation of Compositional, Antioxidant and Colour Profile of Common and Balsamic Vinegars. *Antioxidants 2018, Vol. 7, Page 139*, 7(10), 139. <https://doi.org/10.3390/ANTIOX7100139>
- Singh, V. P. (2018). Recent approaches in food bio-preservation - a review. *Open Veterinary Journal*, 8(1), 104. <https://doi.org/10.4314/OVJ.V8I1.16>
- Siroli, L., Patrignani, F., Serrazanetti, D. I., Tabanelli, G., Montanari, C., Gardini, F., & Lanciotti, R. (2015). Lactic acid bacteria and natural antimicrobials to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples and lamb's lettuce. *Food Microbiology*, 47, 74–84. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2014.11.008>
- Soltani Firouz, M., Alimardani, R., Mobli, H., & Mohtasebi, S. S. (2021). Effect of modified atmosphere packaging on the mechanical properties of lettuce during shelf life in cold storage. *Information Processing in Agriculture*, 8(4), 485–493. <https://doi.org/10.1016/J.INPA.2020.12.005>
- Sourri, P., Tassou, C. C., Nychas, G. J. E., & Panagou, E. Z. (2022). Fruit Juice Spoilage by *Alicyclobacillus*: Detection and Control Methods—A Comprehensive Review. *Foods*, 11(5), 747. <https://doi.org/10.3390/foods11050747>
- Spyrelli, E. D., Doulgeraki, A. I., Argyri, A. A., Tassou, C. C., Panagou, E. Z., & George-John, E. N. (2020). Implementation of Multispectral Imaging (MSI) for Microbiological Quality Assessment of Poultry Products. *Microorganisms 2020, Vol. 8, Page 552*, 8(4), 552. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8040552>
- Spyrelli, E. D., Ozcan, O., Mohareb, F., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. E. (2021). Spoilage assessment of chicken breast fillets by means of fourier transform infrared spectroscopy and multispectral image analysis. *Current Research in Food Science*, 4, 121–131. <https://doi.org/10.1016/J.CRFS.2021.02.007>

- Su, W. H., & Sun, D. W. (2018). Multispectral Imaging for Plant Food Quality Analysis and Visualization. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(1), 220–239. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12317>
- Tournas, V. H. (2005). Moulds and yeasts in fresh and minimally processed vegetables, and sprouts. *International Journal of Food Microbiology*, 99(1), 71–77. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2004.08.009>
- Tournas V., Stack M., Mislivec P., Koch H., & Bandler R. (2001, April). *BAM Chapter 18: Yeasts, Molds and Mycotoxins | FDA*. FDA. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-18-yeasts-molds-and-mycotoxins>
- Trias, R., Bañeras, L., Badosa, E., & Montesinos, E. (2008). Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against foodborne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1–2), 50–60. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2007.11.065>
- Truchado, P., Elsser-Gravesen, A., Gil, M. I., & Allende, A. (2020). Post-process treatments are effective strategies to reduce *Listeria monocytogenes* on the surface of leafy greens: A pilot study. *International Journal of Food Microbiology*, 313, 108390. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2019.108390>
- Tsakanikas, P., Fengou, L. C., Manthou, E., Lianou, A., Panagou, E. Z., & Nychas, G. J. E. (2018). A unified spectra analysis workflow for the assessment of microbial contamination of ready-to-eat green salads: Comparative study and application of non-invasive sensors. *Computers and Electronics in Agriculture*, 155, 212–219. <https://doi.org/10.1016/J.COMPAG.2018.10.025>
- Tsakanikas, P., Pavlidis, D., Panagou, E., & Nychas, G. J. (2016). Exploiting multispectral imaging for non-invasive contamination assessment and mapping of meat samples. *Talanta*, 161, 606–614. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2016.09.019>
- Tsironi, T., Dermesonlouoglou, E., Giannoglou, M., Gogou, E., Katsaros, G., & Taoukis, P. (2017). Shelf-life prediction models for ready-to-eat fresh cut salads: Testing in real cold chain. *International Journal of Food Microbiology*, 240, 131–140. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2016.09.032>
- Uhlig, E., Kjellström, A., Oscarsson, E., Nurminen, N., Nabila, Y., Paulsson, J., Lupan, T., Velpuri, N. S. B. P., Molin, G., & Håkansson. (2022). The live bacterial load and microbiota composition of prepacked “ready-to-eat” leafy greens during household conditions, with special reference to *E. coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 377, 109786. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2022.109786>
- Velderrain-Rodríguez, G. R., Quirós-Sauceda, A. E., González Aguilar, G. A., Siddiqui, M. W., & Ayala Zavala, J. F. (2015). Technologies in fresh-cut fruit and vegetables. *Food Engineering Series*, 79–103. https://doi.org/10.1007/978-3-319-10677-9_5/COVER
- VideometerLite* - *Videometer*. (n.d.). Retrieved March 6, 2024, from <https://videometer.com/videometerlite/>
- Wang, K., Pu, H., & Sun, D. W. (2018). Emerging Spectroscopic and Spectral Imaging Techniques for the Rapid Detection of Microorganisms: An Overview.

- Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(2), 256–273. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12323>
- Webb, L., Ma, L., & Lu, X. (2022). Impact of lactic acid bacteria on the control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Food Quality and Safety*, 6, 1–11. <https://doi.org/10.1093/FQSAFE/FYAC045>
- WHO. (2000). *Surveillance Programme for Control of Europe, foodborne Infections and Intoxications in 8th Report 1999–2000 Wales, Country Reports*.
- Wisplinghoff, H., & Seifert, H. (2010). *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. and miscellaneous Gram-negative bacilli. In *Infectious Diseases: Third Edition* (Vol. 2, pp. 1704–1727). Mosby. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-04579-7.00170-2>
- Wold, S., Sjöström, M., & Eriksson, L. (2001). PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 58(2), 109–130. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(01\)00155-1](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00155-1)
- World Health Organization., & Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2004). *Risk assessment of Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods : technical report*. 269.
- Xagoraris, M., Revelou, P. K., Dedegkika, S., Kanakis, C. D., Papadopoulos, G. K., Pappas, C. S., & Tarantilis, P. A. (2021). SPME-GC-MS and FTIR-ATR spectroscopic study as a tool for unifloral common greek honeys' botanical origin identification. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(7), 3159. <https://doi.org/10.3390/app11073159>
- Yi, J., Huang, K., Young, G. M., & Nitin, N. (2020). Quantitative analysis and influences of contact dynamics on bacterial cross-contamination from contaminated fresh produce. *Journal of Food Engineering*, 270, 109771. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2019.109771>
- Zhang, S., Jie, R. A., Teo, M. J. T., Xinhui, V. T., Koh, S. S., Tan, J. J., Urano, D., Dinish, U. S., & Olivo, M. (2023). A pilot study on non-invasive in situ detection of phytochemicals and plant endogenous status using fiber optic infrared spectroscopy. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-023-48426-5>
- Zhou, B., Luo, Y., Huang, L., Fonseca, J. M., Yan, H., & Huang, J. (2022). Determining effects of temperature abuse timing on shelf life of RTE baby spinach through microbial growth models and its association with sensory quality. *Food Control*, 133, 108639. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2021.108639>
- Zilelidou, E. A., Tsourou, V., Poimenidou, S., Loukou, A., & Skandamis, P. N. (2015). Modeling transfer of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* during preparation of fresh-cut salads: Impact of cutting and shredding practices. *Food Microbiology*, 45(PB), 254–265. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2014.06.019>